



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.011  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.011  
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(1):65-69.

· 基础研究 ·

## 环状 RNA 在肝细胞癌中的差异表达研究

高鹏骥, 陈雷, 高杰, 李照, 王福顺, 冷希圣, 朱继业

(北京大学人民医院 肝胆外科 / 北京市肝硬化肝癌基础研究重点实验室, 北京 100044)

### 摘要

**目的:** 探讨环状 RNA (circRNA) 在肝细胞癌 (HCC) 与正常肝组织中表达谱的差异。

**方法:** 利用 circRNA 芯片技术检测 3 例 HCC 组织和癌旁肝组织 circRNA 的表达谱, 经过对原始数据进行预处理、均一化后, 找出差异表达的 circRNA (与癌旁肝组织比较, HCC 组织中 1.5 倍以上变化并且差异有统计学意义的 circRNA 定义为差异表达的 circRNA)。根据表达差异倍数较高和样本间一致性较好的原则筛选 circRNA, 借助生物信息学软件预测可能受其调控的 miRNA, 结合文献检索初步确定可能在 HCC 中具有重要作用的 circRNA。

**结果:** 与癌旁肝组织比较, HCC 组织中的 circRNA 表达谱发生了明显变化。HCC 组织中, 1.5 倍以上变化的 circRNA 共 82 条, 其中上调 21 条, 下调 61 条; 5 倍以上变化的 circRNA 共 3 条, 其中上调 2 条, 下调 1 条。最终筛选出在 HCC 组织中明显上调的 hsa-circ-0043278 (8.15 倍,  $P=0.002$ )、hsa-circ-0006220 (12.73 倍,  $P=0.033$ ) 和明显下调的 hsa-circ-0065214 (6.28 倍,  $P=0.019$ ); 生物信息学分析和文献检索显示, hsa-miR-520 可能受 hsa-circ-0043278 和 hsa-circ-0006220 调控而影响 HCC 的发生和进展。

**结论:** HCC 组织 circRNA 表达谱发生了显著变化; hsa-circ-0043278 和 hsa-circ-0006220 可能在 HCC 的发生和进展中发挥重要作用。

### 关键词

癌, 肝细胞; RNA, 环状; 微阵列分析

中图分类号: R735.7

## Differentially expressed circular RNAs in human hepatocellular carcinoma

GAO Pengji, CHEN Lei, GAO Jie, LI Zhao, WANG Fushun, LENG Xisheng, ZHU Jiye

(Department of Hepatobiliary Surgery/Beijing Key Surgical Basic Research Laboratory of Liver Cirrhosis and Liver Cancer, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

### Abstract

**Objective:** To analyze the difference in circular RNA (circRNA) expression profiles between hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and normal liver tissue.

**Methods:** The circRNA expression profiles in 3 paired specimens of HCC tissue and its adjacent liver tissue were detected by using the human circRNA microarray. After preprocessing and homogenization of the original data, the differentially expressed circRNAs were searched out (the circRNA in HCC tissue showed a greater than 1.5-fold

基金项目: 北京大学人民医院研究与发展基金资助项目 (RDC2015-01)。

收稿日期: 2016-07-20; 修订日期: 2016-11-12。

作者简介: 高鹏骥, 北京大学人民医院副主任医师, 主要从事肝癌和肝移植的临床及基础方面的研究。

通信作者: 朱继业, Email: gandanwk@vip.sina.com

change which was also statistically significant compared with adjacent liver tissue and was regarded as differentially expressed circRNA). Then, after these circRNAs screening according to the principle of higher fold change and better consistency and their putatively targeting miRNAs prediction by bioinformatics software combined with literature review, the circRNAs that potentially contribute to HCC development were preliminarily identified.

**Results:** The circRNA expression profile in HCC showed remarkable changes compared with adjacent hepatic tissue. In HCC tissue, a total of 82 circRNAs showed a greater than 1.5-fold change, and of them, 21 were up-regulated and 61 were down-regulated; a total of 3 circRNAs showed a greater than 5-fold change, and of them, 2 were up-regulated and 1 was down-regulated. The significantly up-regulated circRNA hsa-circ-0043278 (8.15 fold,  $P=0.002$ ) and hsa-circ-0006220 (12.73 fold,  $P=0.033$ ), and significantly down-regulated circRNA hsa-circ-0065214 (6.28 fold,  $P=0.019$ ) were finally obtained after screening. Bioinformatics analysis and literature review suggested that hsa-miR-520 was potentially regulated by hsa-circ-0043278 and hsa-circ-0006220, which contributed to the occurrence and development of HCC.

**Conclusion:** The circRNA expression profile in HCC is greatly changed. Hsa-circ-0043278 and hsa-circ-0006220 may play important roles in the occurrence and development of HCC.

#### Key words

Carcinoma, Hepatocellular; RNA, Circular; Microarray Analysis

CLC number: R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的消化系统恶性肿瘤, 严重危害患者的生命健康。尽管已经病毒性肝炎、酒精性肝病等 HCC 的高危因素已经明确<sup>[1-4]</sup>, 但是具体的发病机制尚不清楚, 早期诊断的临床生物标记物也有待进一步发掘。近年来, 非编码 RNA 领域的进展为 HCC 的研究带来了新的希望, 研究发现长链非编码 RNA 和微小 RNA 均在 HCC 与癌旁组织中存在差异表达, 可能与肿瘤的生物行为密切相关<sup>[5-6]</sup>。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是新近确认的一类特殊的非编码 RNA 分子, 通过与疾病关联的 miRNA 相互作用, 在疾病的发生发展过程中发挥着重要的调控作用<sup>[7-10]</sup>。文献<sup>[11-12]</sup>报道 circRNA 在结肠癌中存在特异性差异表达和基因调控功能, Li 等<sup>[12-13]</sup>对胃癌和癌旁非肿瘤组织的研究发现, hsa-circ002059 在胃癌中的表达显著下调, 有望成为诊断胃癌的标记物。circRNA 是否在 HCC 中发挥作用, 目前尚不明确。对其进行深入研究有可能为阐明 HCC 的发病机制、发现可用于早期诊断的生物标志物取得突破。

本研究预期筛选出 HCC 中差异表达的 circRNA, 为 HCC 的早期诊断和治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本收集

3 例 HCC 和对应的癌旁组织来源于 2015 年 9 月

在北京大学人民医院接受肝癌切除手术的患者。患者的 TNM 分期均为 I 期, 病灶为实性, 最大径线分别为 2.7、3.5、6.7 cm。标本离体后 10 min 内取材, 以生理盐水冲洗后装入冻存管投入液氮罐冷藏, 随后转入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存至提取总 RNA。HCC 和癌旁组织均经病理证实。

### 1.2 circRNA 芯片实验操作流程

总 RNA 提取: 取 100 mg 标本, 应用 RNA 抽提试剂 TRIzol (Invitrogen 公司) 按照试剂说明分别从 HCC 组织和癌旁肝组织提取总 RNA, 应用 NanoDrop ND1000 进行纯度和浓度测定; RNA 标记: 应用 RNase R (Epicentre 公司) 处理总 RNA, 去除线性 RNA, 富集 circRNA, 应用随机引物按照 Arraystar Supper RNA Labeling Protocol 对 circRNA 进行扩增并转录为荧光 cRNA; 芯片杂交: 将荧光标记的 cRNA 应用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司) 纯化后在 circRNA 芯片 ( $8 \times 15\text{ K}$ , Arraystar 公司) 上杂交, 于分子杂交仪 (Agilent 公司)  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 17 h; 芯片扫描: 杂交后的芯片洗片后, 应用 Agilent Scanner G2505C 扫描。

### 1.3 数据采集与分析流程

原始数据提取: 将芯片扫描图片导入 Agilent Feature Extraction 软件 (版本 11.0.1.1) 提取原始数据; 数据分析: 应用 R 软件包对原始数据进行标准化并进行分析, 两组样本间差异表达的 circRNA 通过变化倍数进行筛选, 组间比较采用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 1.4 生物信息学分析

根据差异表达变化倍数筛选 circRNA, 应用 Arraystar 的 miRNA 目标预测软件 (一款基于 TargetScan<sup>[14]</sup> 和 miRanda<sup>[15]</sup> 的软件) 预测与之相互作用的 miRNA, 文献检索已经证实的在肿瘤发生发展中具有重要作用的 miRNA, 初步确定在 HCC 中具有重要作用的 circRNA。

## 2 结 果

### 2.1 识别具有统计学意义的差异表达的 circRNA

与癌旁肝组织比较, HCC 组织中的 circRNA 表达谱发生了明显变化 (图 1)。图 1 左侧/右侧红点分别表示在 HCC 中表达下调/上调的满足差异倍数 1.5 倍以上且具有统计学意义的 circRNA。

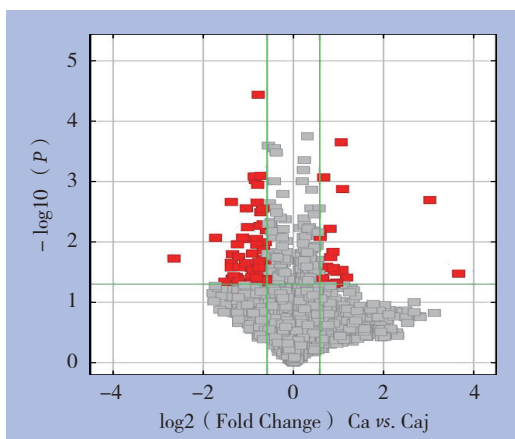


图 1 circRNA 火山图

Figure 1 Volcano plot of circRNAs

### 2.2 聚类分析 circRNA 表达谱的差异

绘制 circRNA 聚类图, 结果显示在 HCC 和癌旁组织样本间 circRNA 的表达谱存在差异 (图 2)。

### 2.3 HCC 中差异表达 circRNA 的筛选

将差异表达 1.5 倍以上且  $P < 0.05$  的 circRNA 确定为差异表达的 circRNA。结果显示 HCC 组织

和癌旁组织相比, 1.5 倍以上变化的 circRNA 共 82 条, 其中上调的共 21 条, 下调的共 61 条; 5 倍以上变化的共 3 条, 其中上调的 2 条, 分别为 hsa-circ-0043278 和 hsa-circ-0006220, 下调的 1 条为 hsa-circ-0065214。部分差异表达的 circRNA 见表 1。

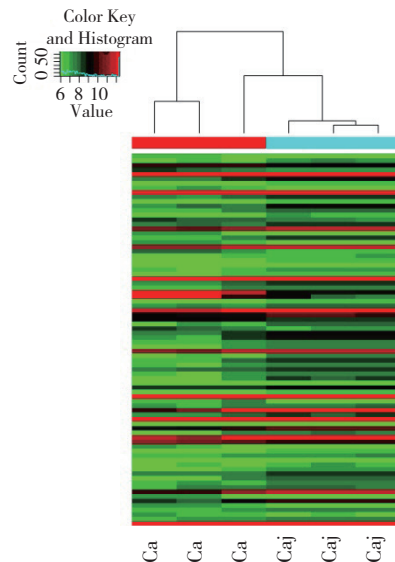


图 2 差异 circRNA 聚类图

Figure 2 Clustering plot of the differentially expressed circRNAs

表 1 部分差异表达的 circRNA

Table 1 Part of the differentially expressed circRNAs

circRNA	变化倍数	P	调节方向	染色体定位
hsa-circ-0043278	8.15	0.002	上调	chr17
hsa-circ-0006220	12.73	0.033	上调	chr17
hsa-circ-0065214	6.28	0.019	下调	chr3

### 2.4 初步确定可能在 HCC 中具有重要作用的 circRNA

应用 Arraystar 的 miRNA 目标预测软件对差异表达变化倍数较高的 circRNA 进行分析, 得到可能与之相互作用的 miRNA (表 2)。通过文献检索发现, hsa-miR-520d-3p 在胃癌和 HCC 组织中低表达, 并与肿瘤恶性程度和化疗敏感性有关。

表 2 应用 Arraystar 预测的可能与 circRNA 相互作用的 miRNA

Table 2 The miRNAs that possibly interacted with circRNAs predicted by Arraystar software

circRNA	可能与 circRNA 相互作用的 miRNA
hsa-circ-0043278	hsa-miR-103a-2-5p、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-302b-3p
hsa-circ-0006220	hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-197-5p
hsa-circ-0065214	hsa-miR-608、hsa-miR-503-5p、hsa-miR-214-3p、hsa-miR-873-5p、hsa-miR-574-5p

### 3 讨论

circRNA是一类特殊的非编码RNA分子,大量存在于真核细胞,具有一定的组织、时序和疾病特异性<sup>[16-18]</sup>。circRNA又被称为miRNA海绵,含有miRNA的多个串联结合位点,通过竞争性结合miRNA来调控其表达,进而影响疾病的发生发展<sup>[19-20]</sup>。研究<sup>[21-22]</sup>显示,circRNA有望作为生物标记用于肿瘤的诊断和治疗。circRNA在HCC中的研究尚处于初级阶段,本研究结合芯片技术及生物信息学分析,希望在HCC组织中发现circRNA的差异表达,为HCC的诊断和治疗提供新的思路。

本研究中采用的circRNA芯片为Arraystar公司推出的全球首款circRNA芯片,采用特异性剪接位点探针与外切酶预处理双重保障,能够准确检测样本中circRNA的表达。借助芯片对HCC和癌旁组织提取的RNA进行分析,获得了HCC和癌旁组织中的circRNA表达谱。按照差异表达倍数 $\geq 1.5$ 且 $P < 0.05$ 进行筛选,获得了82条差异表达的circRNA。其中上调的共21条,下调的共61条;5倍以上变化的共3条,其中上调的2条,下调的1条。在HCC组织中有circRNA的明显上调和下调,提示这些circRNA可能参与了HCC的发生、发展及分子调控过程。

对82条具有统计学意义的差异表达的circRNA进行分析发现,有3条circRNA差异表达倍数较高,且在3对样本中具有较好的一致性。通过生物信息学软件预测出这3条circRNA可能结合的miRNA后,通过文献检索发现,已有研究证实与hsa-circ-0043278和hsa-circ-0006220存在结合位点的hsa-miR-520d-3p在胃癌和HCC的发生发展过程中具有调控作用<sup>[23-25]</sup>。研究显示,hsa-miR-520d-3p能够抑制肿瘤的增殖和转移,hsa-miR-520d-3p水平下调将导致不良预后。因此,初步确定hsa-circ-0043278和hsa-circ-0006220可能在HCC中具有重要作用。

本研究的局限性在于仅选取了3对样本进行分析,数量相对较少,存在一定的偶然性;实验采用的芯片为Human Circlar RNA Array V1.0,有许多新近发现的circRNA未纳入;通过生物信息学预测和文献检索确定的hsa-circ-0043278和hsa-circ-0006220尚未进行实验验证。下一步将增加样

本量进行芯片杂交分析,对初步确定的circRNA进行qRTPCR验证,构建慢病毒载体转染HCC细胞,进行功能实验。

### 参考文献

- [1] Wanich N, Vilaichone RK, Chotivitayatarakorn P, et al. High prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection in Thailand[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(6):2857-2860.
- [2] Joshi K, Kohli A, Manch R, et al. Alcoholic liver disease: high risk or low risk for developing hepatocellular carcinoma?[J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 20(3):563-580. doi: 10.1016/j.cld.2016.02.012.
- [3] Minuk GY, Bautista W, Klein J. Evidence of hepatitis B virus infection in cancer and noncancer stem cells associated with human hepatocellular carcinoma[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2016, 2016:8931591. doi: 10.1155/2016/8931591.
- [4] 付囡, 陈茂伟. 丙型肝炎病毒致癌机制及其防治研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(24):4504-4506. doi: 10.3969/j.issn.1006-2084.2014.24.035.  
Fu N, Chan MW. Research Progress on the Carcinogenesis Mechanism of Hepatitis C Virus and Its Prevention[J]. *Medical Recapitulate*, 2014, 20(24):4504-4506. doi: 10.3969/j.issn.1006-2084.2014.24.035.
- [5] 张立, 张迪, 李孝彬, 等. microRNA-616在肝癌中的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(7):991-997. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.010.  
Zhang L, Zhang D, Li XB, et al. Expression of microRNA-616 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(7):991-997. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.07.010.
- [6] 姚凯, 张光军, 黄忠明, 等. 长链非编码RNA MALAT1在肝癌中表达及功能研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):90-96. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014.  
Yao K, Zhang GJ, Huang ZM, et al. Long non-coding RNA MALAT1 expression in hepatocellular carcinoma and its action[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):90-96. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014.
- [7] 刘彦, 周超. ciRS-7/miR-7轴调控肿瘤生长转移的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(7):1027-1031. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.020.  
Liu Y, Zhou C. Regulative role of ciRS-7/miR-7 axis in tumor growth and metastasis: recent advances[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(7):1027-1031. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.020.

- [8] Salzman J. Circular RNA expression: Its potential regulation and function[J]. Trends Genet, 2016, 32(5):309–316. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.002.
- [9] Xuan L, Qu L, Zhou H, et al. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2):932–939.
- [10] Ahmed I, Karedath T, Andrews SS, et al. Altered expression pattern of circular RNAs in primary and metastatic sites of epithelial ovarian carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(24):36366–36381. doi: 10.18632/oncotarget.8917.
- [11] Wang X, Zhang Y, Huang L, et al. Decreased expression of hsa-circ-001988 in colorectal cancer and its clinical significances[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(12):16020–16025.
- [12] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2015, 444:132–136. doi: 10.1016/j.cca.2015.02.018.
- [13] Li Y, Zheng Q, Bao C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Cell Res, 2015, 25(8):981–984. doi: 10.1038/cr.2015.82.
- [14] Enright AJ, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in Drosophila[J]. Genome Biol, 2003, 5(1):R1.
- [15] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4):271–282. doi: 10.1038/nrg3162.
- [16] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(7):3131–3142. doi: 10.1093/nar/gkr1009.
- [17] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30733. doi: 10.1371/journal.pone.0030733.
- [18] Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules[J]. FASEB J, 1993, 7(1):155–160.
- [19] Hentze MW, Preiss T. Circular RNAs: splicing's enigma variations[J]. EMBO J, 2013, 32(7):923–925. doi: 10.1038/emboj.2013.53.
- [20] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441):384–388. doi: 10.1038/nature11993.
- [21] Qu S, Song W, Yang X, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Genom Data, 2015, 5:385–387. doi: 10.1016/j.gdata.2015.07.017.
- [22] Qin ML, Liu G, Huo XS, et al. Has-circ-0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomarkers, 2016, 16(1):161–169. doi: 10.3233/CBM-150552.
- [23] Li R, Yuan W, Mei W, et al. MicroRNA 520d-3p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by downregulating EphA2 expression[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 396(1/2):295–305. doi: 10.1007/s11010-014-2164-6.
- [24] Jiang H, Dong Q, Luo X, et al. The monoclonal antibody CH12 augments 5-fluorouracil-induced growth suppression of hepatocellular carcinoma xenografts expressing epidermal growth factor receptor variant III[J]. Cancer Lett, 2014, 342(1):113–120. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.038.
- [25] Deshpande RP, Chandra Sekhar YB, Panigrahi M, et al. SIRP Alpha Protein Downregulates in Human Astrocytoma: Presumptive Involvement of Hsa-miR-520d-5p and Hsa-miR-520d-3p[J]. Mol Neurobiol, 2016. [Epub ahead of print]

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 高鹏骥, 陈雷, 高杰, 等. 环状RNA在肝细胞癌中的差异表达研究[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(1):65–69. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.011

Cite this article as: Gao PJ, Chen L, Gao J, et al. Differentially expressed circular RNAs in human hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(1):65–69. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.011