



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.012
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.012
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(9):1109-1114.

· 基础研究 ·

环状 RNA FBLIM1 在肝细胞癌中生物学功能的初步研究

彭娅敏¹, 夏发达², 王文龙², 姚磊², 梁婕¹, 白宁³

(中南大学湘雅医院 1. 国际医疗部 2. 普通外科 3. 急诊科, 湖南长沙 410008)

摘要

目的: 探讨环状 RNA FBLIM1 (circFBLIM1) 对肝细胞癌 (HCC) 增殖与侵袭能力的影响。

方法: 将 HCC 细胞系 HepG2、7402、97H 分别转染 circFBLIM1 干扰序列 (si-circFBLIM1) 和阴性对照序列后, 用 qRT-PCR 验证转染效果, 然后分别用 CCK-8 实验和 Transwell 实验检测细胞的增殖情况与侵袭能力; 将 10 只裸鼠皮下接种 HepG2 细胞后随机均分为两组, 分别以 40 μ L si-circFBLIM1 或阴性对照序列进行原位注射, 1 次 /4 d, 每 4 天记录移植瘤体积, 28 d 后完整剥离肿瘤称重。

结果: qRT-PCR 结果显示, 3 种 HCC 细胞系转染 si-circFBLIM1 后, circFBLIM1 的表达均明显降低 (均 $P < 0.05$)。CCK-8 实验与 Transwell 实验结果显示, 3 种 HCC 细胞系转染 si-circFBLIM1 后的增殖能力与侵袭能力均明显减弱 (均 $P < 0.05$)。裸鼠移植瘤实验结果显示, 注射 si-circFBLIM1 的移植瘤增长速度明显减慢, 肿瘤体积与质量均明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: circFBLIM1 具有促进 HCC 细胞增殖与侵袭的作用, 可能是 HCC 恶性生物学特征的重要调节因子, 抑制 circFBLIM1 的表达可能是 HCC 有效的治疗策略。

关键词

癌, 肝细胞; RNA, 环状; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.7

Preliminary study of the biological function of circular RNA FBLIM1 in hepatocellular carcinoma

PENG Emin¹, XIA Fada², WANG Wenlong², YAO Lei², LIANG Jie¹, BAI Ning³

(1. Department of International Medical Services 2. Department of General Surgery 3. Department of Emergency Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of circular RNA FBLIM1 (circFBLIM1) on proliferative and invasion abilities of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Methods: The HCC cell lines HepG2, 7402 and 97H were transfected with circFBLIM1 interference sequences (si-circFBLIM1) and negative control sequences respectively. The transfection efficiency was examined by qRT-PCR, and then, the proliferative and invasion abilities of the cells were determined by CCK-8 assay and Transwell assay, respectively. Ten nude mice were randomized into two groups after subcutaneously inoculated with HepG2 cells, and were injected in situ with 40 μ L si-circFBLIM1 and negative control sequences one time every 4 days. The volumes of the xenograft tumors were recorded every 4 days, and the xenograft tumors were completely

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ40500)。

收稿日期: 2019-01-12; **修订日期:** 2019-08-03。

作者简介: 彭娅敏, 中南大学湘雅医院主管护师, 主要从事慢病管理临床与基础方面的研究。

通信作者: 白宁, Email: baining80@csu.edu.cn

enucleated and weighed after 28 d.

Results: The results of qRT-PCR showed that the circFBLIM1 expressions in the three different HCC cells were significantly reduced after si-circFBLIM1 transfection (all $P < 0.05$). The results of CCK-8 assay and Transwell assay showed that the proliferative and invasion abilities of the three types of HCC cells were all significantly weakened after si-circFBLIM1 transfection (all $P < 0.05$). The results of nude mouse tumor transplantation showed that the growth speed was significantly slow down, and both volume and weight were significantly reduced in the xenograft tumor with si-circFBLIM1 injection (all $P < 0.05$).

Conclusion: CircFBLIM1 can promote the proliferation and invasion of HCC cells, and is probably an important regulatory factor for the malignant biological features of HCC. Inhibition of circFBLIM1 expression may be an effective therapeutic strategy against HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; DNA, Circular; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.7

原发性肝癌是世界范围内最为常见的消化系统恶性肿瘤之一，至今仍没有得到充分有效的控制，呈现较高的病死率^[1-3]。原发性肝癌病理类型包括肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）（75%~85%）、胆管细胞癌（10%~15%）、混合型肝癌以及其他罕见类型。目前，针对HCC的治疗方法主要是以外科手术为主的包括：肝移植、经皮穿刺射频消融、介入治疗和分子靶向药物、免疫治疗药物等为辅的综合治疗^[4-6]。然而，尽管手术技术和与之相配套的综合治疗方案在过去几十年不断改善，但HCC的预后仍然很差^[7-9]。大部分HCC患者在初诊的时候已经处于晚期，失去了手术治疗的机会，并且即使接受了系统的治疗，HCC患者5年复发率也高达70%^[10]。因此，对HCC发生发展的分子机制进行深入研究，寻找新的分子靶点以发掘更有效的HCC治疗策略成为需迫切解决的问题。

环状RNA（circular RNA, circRNA）是内源性非编码RNA的一类，其结构为共价环状闭合的单链RNA。近年来，随着生物信息学以及RNA测序技术的发展，研究者逐渐认识到circRNA在生命科学当中的重要作用。Sand等^[11]发现23个circRNA在基底细胞癌中上调，48个下调。另有研究^[12]发现hsa_circ_002059在胃癌的表达明显比癌旁组织低，可作为胃癌的生物标志物。与mRNA和lncRNA相比，HCC中circRNA的研究仍处于初步阶段，在HCC中circRNA的作用及分子机制仍然不明。到目前为止，在HCC中仅鉴定和表征了少量功能性circRNA。笔者前期对HCC患者的肿瘤组织及其癌旁肝组织进行了高通量的

circRNA芯片筛选，发现hsa_circ_0010090是在HCC细胞系当中上调最为明显的环状RNA，根据人类参考基因组（GRCh37/hg19），发现hsa_circ_0010090（chr1: 16084668-16113084）是源自于位于染色体1p36.21上的FBLIM1基因，故将其命名为“circFBLIM1”。本研究将进一步探讨circFBLIM1在HCC中的功能，为发现circRNA在HCC中的诊断、治疗及预后评估方面的潜在价值提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞株及培养

HCC细胞系HepG2、7402、97H均购买自美国ATCC，并且严格按照美国模式培养物保藏所的要求进行培养。所有细胞系在使用后每6个月通过短串联重复DNA分析重新鉴定，并且排除支原体感染。所有细胞培养于含有10%FBS（巴西GIBCO）的DMEM（美国Invitrogen）中，于37℃，5%CO₂条件下细胞培养箱中培养。

1.2 实验动物

4周龄，BALB/c雌性裸鼠，30只，（20±2）g，由上海斯莱克实验动物有限公司提供。在无特定病原体条件下饲养，饲养地点：中南大学实验动物部。所有动物研究均经中南大学湘雅医院的机构动物护理和使用委员会（IACUC）批准。根据IACUC方案遵循标准动物护理和实验室指南。

1.3 主要试剂及仪器

RNAiso plus、逆转录试剂盒及qRT-PCR试剂盒均购自日本Takara公司；Transwell小室、基

质胶Matrigel (BD); ThermoND2000C超微量分光光度计(Thermo)、GeneAmp PCR system 9700扩增仪(PerkinElmer)、LightCycler®480 II System (Roche)。circFBLIM1干扰序列(si-circFBLIM1): GCA AUA CAC AAG UGC AUA CTT; 阴性对照序列: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT (广州锐博生物科技有限公司合成)。

1.4 方法

1.4.1 细胞转染 取对数生长期的HCC细胞株接种于6孔板(5×10^5 /孔)中待生长至汇合度为50%时,按照Lipofectamine2000说明书要求分别转染si-circFBLIM1与阴性对照序列。

1.4.2 qRT-PCR 提取好的RNA进行浓度测定,各取1 μg RNA参照逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA。将cDNA进行一定的稀释,作为RT-PCR的模板,参照荧光定量PCR试剂盒(SYBR染料法)说明书进行PCR。mRNA相对表达水平的定量采用比较Ct法来计算相对定量,内参选择GAPDH。

1.4.3 CCK-8实验 HCC细胞株转染后24 h后,以100 μL 细胞悬液(约 1×10^3 细胞)接种到96孔板,分别在0、1、2、3、5 d后加入10 μL /孔CCK-8溶液,避光37 $^{\circ}\text{C}$ 培养2 h,用Bio-Tek EPOCH2检测450 nm波长处的吸光度。

1.4.4 Transwell试验 HCC细胞株转染后24 h后,采用胰酶消化细胞并离心弃上清,用无血清的培养基重悬细胞,按照1:8比例稀释50 mg/L的Matrigel后,加50 μL 稀释后的Matrigel包被Transwell小室底部膜,将 1×10^5 /100 μL 细胞悬液接种到上室,下室加500 μL 含10%FBS的DMEM培养液,48 h后取出小室,弃上室培养基,用棉签拭掉顶部的未侵入细胞,在光学显微镜下计数入侵细胞。

1.4.5 裸鼠皮下成瘤实验 将HepG2细胞悬浮于无血清培养液中,调整浓度至 5×10^7 /mL,将细胞接种于裸鼠一侧腋部皮下后为2组,每组5只裸鼠,以40 μL 阴性对照序列或si-circFBLIM1进行接种部位原位多点注射,1次/4 d;记录观察裸鼠的一般情况、移植瘤形成的时间及大小;每4天用游标卡尺测移植瘤最长径(L)和最短径(W),连续测量28 d,绘制移植瘤生长曲线;实验结束后,将肿瘤完整剥离并进行大体照相,测量肿瘤体积及质量。

1.5 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件进行统计学分

析。分别使用t检验、One-way ANOVA进行各组之间的差异分析。所有数据显示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰效果检测

qRT-PCR检测结果显示,转染si-circFBLIM1后,HepG2、7402和97H细胞中的circFBLIM1的表达水平均明显下调,与各自转染阴性对照序列的同种细胞比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$) (图1)。

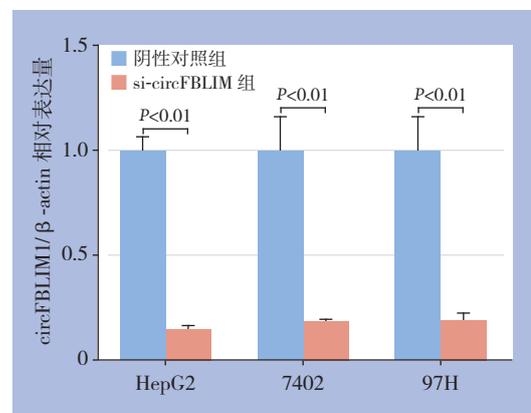


图1 si-circFBLIM1在3种HCC细胞中的转染效率检测

Figure 1 Determination of the transfection efficiency of si-circFBLIM1 in the three different HCC cells

2.2 下调circFBLIM1对HCC细胞增殖的影响

CCK8实验结果显示,在转染si-circFBLIM1后,3种HCC细胞的增殖能力均明显减弱,在450 nm处的OD值在转染后3、4、5 d明显均较各自阴性对照组明显降低(均 $P < 0.01$) (图2)。

2.3 下调circFBLIM1对HCC细胞侵袭能力的影响

Transwell实验结果显示,3种HCC细胞转染si-circFBLIM1后,细胞穿过Transwell膜的数目与各自阴性对照组比较均明显减少(均 $P < 0.01$) (图3)。

2.4 下调circFBLIM1对HCC细胞在裸鼠体内生长的影响

皮下注射裸鼠成瘤实验中,通过连续28 d的观察,结果发现利用si-circFBLIM1下调HepG2细胞中circFBLIM1的表达水平之后,HCC在裸鼠体内的生长速度明显减慢,肿瘤体积与质量明显降低,与阴性对照组有明显差异(均 $P < 0.01$) (图4)。

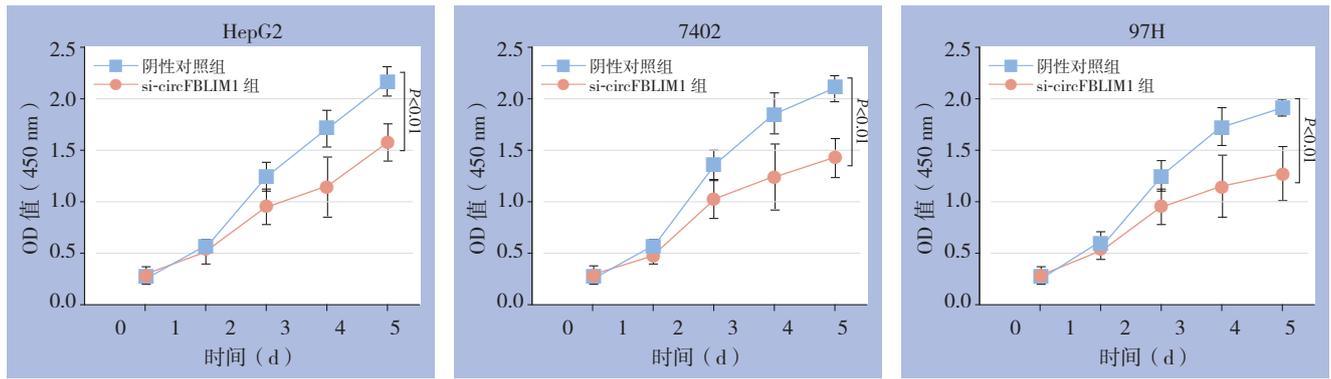


图 2 CCK-8 实验检测 HCC 细胞增殖

Figure 2 Proliferation of HCC cells detected by CCK-8 assay

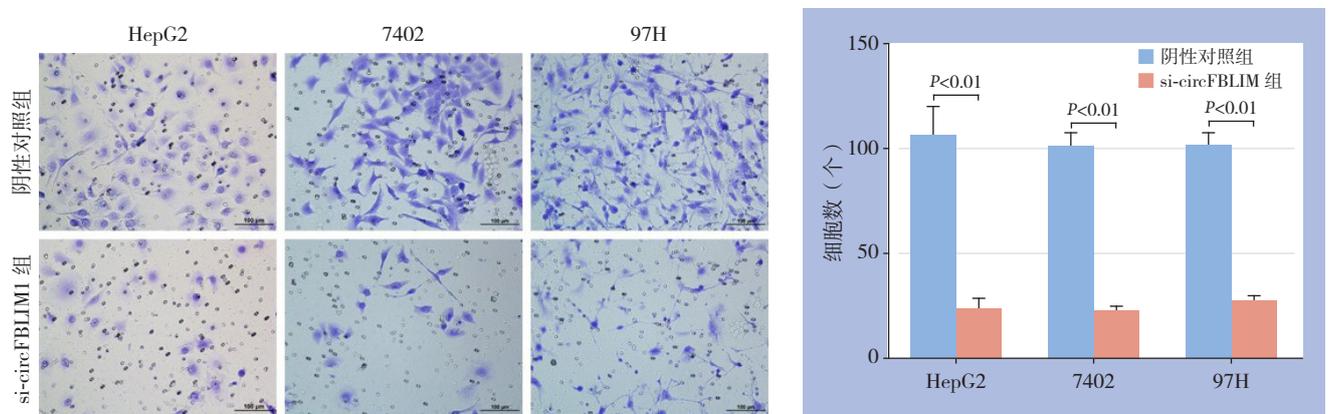


图 3 Transwell 实验检测 HCC 细胞的侵袭能力 (× 200)

Figure 3 Invasion ability measured by Transwell assay (× 200)

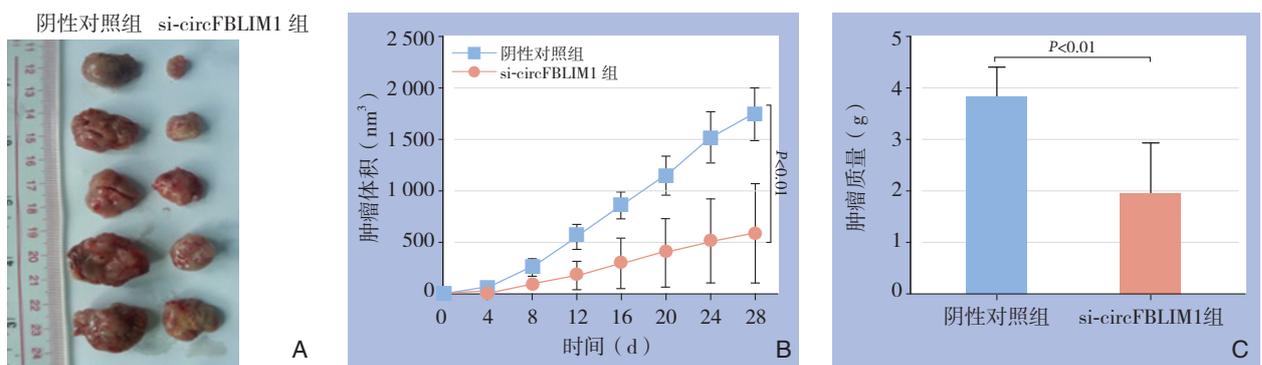


图 4 裸鼠移植瘤实验 A: 裸鼠体内剥出的移植瘤; B: 肿瘤的生长曲线; C: 两组裸鼠移植瘤质量比较

Figure 4 Nude mouse tumor transplantation mode A: Xenograft tumors enucleated from the nude mice; B: The growth curves of the tumors; C: Comparison of the weights of the tumors between the two groups of mice

3 讨论

circFBLIM1即hsa_circ_0010090 (chr1: 16084668-16113084) , 其来源于FBLIM1基因 (1p36.21) 。通过调研文献, circFBLIM1的生物学功能到目前为止尚未见报道。为了初步评估circFBLIM1在HCC中的生物学功能, 本研究通

过转染si-circFBLIM1的方式来下调HCC细胞系 (HepG2、7402和97H) 中circFBLIM1的表达。通过CCK-8细胞增殖实验发现, 在HCC细胞中下调circFBLIM1的表达, 能够显著抑制HCC细胞的增殖能力。后续的Transwell实验结果显示, 通过抑制circFBLIM1的表达能够使得HCC细胞系穿过Transwell膜的能力大大下降, 提示侵袭能力受到

抑制。在皮下注射裸鼠成瘤实验当中,通过向10只BALB/c裸鼠皮下注射HepG2细胞,并瘤内注射阴性对照序列或si-circFBLIM1进行处理,结果发现,瘤内注射si-circFBLIM1后,肿瘤体积显著缩小,此项结果提示,下调circFBLIM1能显著减慢HCC体内肿瘤生长速度。以上实验结果表明,下调circFBLIM1能抑制HCC细胞增殖、侵袭、促进凋亡,在体内抑制肿瘤生长,进一步从反向证明了中circFBLIM1在HCC中发挥促进细胞增殖、侵袭的作用。

文献^[13-14]报道,HCC组织中circMTO1的减少可以作为患者生存率低的预后预测因子。Lin等^[15]报道在各种HCC细胞系和HCC患者的组织样品中,circCDK13表达受到抑制。在HCC细胞中诱导的circCDK13过表达显著抑制了它们的迁移速率,改变了细胞周期进程,并抑制了细胞迁移和侵袭能力。微阵列分析还鉴定了由circCDK13调节的许多下游基因,特别JAK/STAT以及PI3K/Akt信号通路。致瘤性测定的结果显示,circCDK13过表达显著抑制裸鼠的HCC进展。Qin等^[16]研究发现,基于89对HCC组织和邻近肝组织样本的分析,hsa_circ_0001649表达在HCC组织中显著下调($P=0.0014$),并且ROC曲线下面积(AUC)为0.63。此外,hsa_circ_0001649表达与HCC中肿瘤大小($P=0.045$)和瘤栓的发生($P=0.017$)密切相关。

近来,随着生物信息学以及RNA测序技术的发展,研究者逐渐认识到circRNA在生命科学当中的重要作用。据报道,RNA可以作为竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA),通过竞争共有的miRNA而互相调节^[17-18]。circRNA主要存在于细胞胞质内,具有比一般的ceRNA更多更稳定的miRNA应答元件(MRE),因此circRNA能够更有效的结合miRNA,成为miRNA海绵,作为ceRNA发挥作用,通过自身的MRE竞争结合miRNA,调控靶基因的表达水平,最终影响其功能^[19]。譬如过表达CDR1as能够有效地“吸附”miR-7,从而下调miR-7,导致miR-7靶标的表达水平升高^[20-21]。Zheng等^[22]证实circHIPK3通过充当海绵“吸附”miR-124等miRNA,从而抑制肿瘤的增殖。Hansen等^[23]发现circRNA Sry可充当miR-138的海绵。Yang等^[24]研究发现来自FOXO3的circRNA hsa_circRNA_104170,通过吸附miR-22等一系

列miRNA,抑制乳腺癌的细胞增殖及肿瘤血管生成。这些研究结果表明:circRNA在多种肿瘤中差异表达,可作为关键调节分子,通过miRNA海绵的作用,影响肿瘤的多种生物学行为,发挥重要的调控功能。

目前,circRNA在HCC中研究仍处于起步阶段,对其在HCC的功能了解甚少,而机制的研究更为缺乏。本研究虽然初步观察了circFBLIM1在HCC中的基本生物学作用,但对其作用机制仍未做深入研究。笔者推测circFBLIM1也可能通过充当海绵“吸附”miRNA,进而通过ceRNA机制调节miRNA靶基因的表达参与HCC的发生与发展。因此,本研究后续将通过各种生物信息学方法与不同分子生物学手段预测并查明circFBLIM1的靶miRNA,并进一步构建全面的circFBLIM1相关ceRNA网络,系统探明circFBLIM1在HCC中的功能及作用机制。

总之,本研究基于前期发现circFBLIM1在HCC中的高表达,初步证明circFBLIM1能促进HCC细胞的增殖与侵袭,在HCC中发挥促瘤作用。circFBLIM1可能作为HCC诊断治疗中的新的生物标志物和潜在靶点。

参考文献

- [1] Sia D, Villanueva A, Friedman SL, et al. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):745-761. doi: 10.1053/j.gastro.2016.11.048.
- [2] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1):151-171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
- [3] Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives[J]. *Gut*, 2014, 63(5):844-855. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306627.
- [4] Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy[J]. *Cancer Lett*, 2016, 379(2):191-197. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.018.
- [5] Fu J, Wang H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China [J]. *Cancer Lett*, 2018, 412:283-288. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.008.
- [6] 王志明,陶一明,黄云,等.联合肝脏离断和门静脉切断二步肝切除术在肝炎后肝硬化肝癌中的应用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(7): 866-872. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.001.

- Wang ZM, Tao YM, Huang Y, et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy procedure in treatment of hepatocellular carcinoma with post-hepatic cirrhosis[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7): 866–872. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.001.
- [7] Crissien AM, Frenette C. Current management of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterol Hepatol (NY), 2014, 10(3):153–161.
- [8] Raza A, Sood GK. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(15):4115–4127. doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4115.
- [9] Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future[J]. Ann Surg, 2011, 253(3):453–469. doi: 10.1097/SLA.0b013e31820d944f.
- [10] Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5):1501–1512. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.006.
- [11] Sand M, Bechara FG, Sand D, et al. Circular RNA expression in basal cell carcinoma[J]. Epigenomics, 2016, 8(5):619–632. doi: 10.2217/epi-2015-0019.
- [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]. Clin Chim Acta, 2015, 444:132–136. doi: 10.1016/j.cca.2015.02.018.
- [13] Shi L, Yan P, Liang Y, et al. Circular RNA expression is suppressed by androgen receptor (AR)-regulated adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR1) in human hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(11):e3171. doi: 10.1038/cddis.2017.556.
- [14] Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. Hepatology, 2017, 66(4):1151–1164. doi: 10.1002/hep.29270.
- [15] Lin Q, Ling YB, Chen JW, et al. Circular RNA circCDK13 suppresses cell proliferation, migration and invasion by modulating the JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in liver cancer[J]. Int J Oncol, 2018, 53(1):246–256. doi: 10.3892/ijo.2018.4371.
- [16] Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2016, 16(1):161–169. doi: 10.3233/CBM-150552.
- [17] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. Cell, 2011, 146(3):353–358. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [18] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483):344–352. doi: 10.1038/nature12986.
- [19] Park HJ, Ji P, Kim S, et al. 3' UTR shortening represses tumor-suppressor genes in trans by disrupting ceRNA crosstalk[J]. Nat Genet, 2018, 50(6):783–789. doi: 10.1038/s41588-018-0118-8.
- [20] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(18):5609–5612. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1568.
- [21] Pan H, Li T, Jiang Y, et al. Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):440–446. doi: 10.1002/jcb.26201.
- [22] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. Nat Commun, 2016, 7:11215. doi: 10.1038/ncomms11215.
- [23] 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.
- [24] Yang W, Du WW, Li X, et al. Foxo3 activity promoted by non-coding effects of circular RNA and Foxo3 pseudogene in the inhibition of tumor growth and angiogenesis[J]. Oncogene, 2016, 35(30):3919–3931. doi: 10.1038/onc.2015.460.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 彭炯敏, 夏发达, 王文龙, 等. 环状RNA FBLIM1在肝细胞癌中生物学功能的初步研究[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(9):1109–1114. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.012

Cite this article as: Peng EM, Xia FD, Wang WL, et al. Preliminary study of the biological function of circular RNA FBLIM1 in hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2019, 28(9):1109–1114. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.09.012