



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.008
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.008
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(2):199-207.

· 基础研究 ·

肝内胆管细胞癌中 hsa_circ_0089153 的表达及其生物学功能

陈小彬^{1,2}, 吴嘉艺^{1,3}, 黄理铭^{1,3}, 白燕南^{1,3}, 唐忠², 严茂林^{1,3}

(1. 福建医科大学省立临床医学院, 福建 福州 350001; 2. 福建省南平市第一医院 普通外科, 福建 南平 353000; 3. 福建省立医院 肝胆外科, 福建 福州 350001)

摘要

背景与目的: 肝内胆管细胞癌 (ICC) 是仅次于肝细胞癌的第二大肝脏恶性肿瘤, 其发病隐匿、恶性度高、预后差。环状 RNA (circRNA) 异常表达与多种恶性肿瘤的发生发展关系密切, 但 circRNA 与 ICC 的关系研究较少。因此, 本研究初步探讨 ICC 中差异表达 circRNA 及其生物学功能。

方法: 采用福建省立医院经病理确诊的 5 例 ICC 患者标本, 通过高通量 circRNA 芯片技术筛选出 ICC 及对应癌旁组织中差异表达的 circRNA, 进一步在长度 500~1 500 bp 之间选取其中变化最为明显的 circRNA, 并通过 qRT-PCR 进行验证; 然后在 HCCC-9810、RBE 细胞系中通过慢病毒过表达该 circRNA, 应用 CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 实验和流式细胞术分析该 circRNA 对 ICC 细胞生物学功能的影响。

结果: 与癌旁正常组织比较, ICC 中共有 76 个差异表达的 circRNA, 包括 63 个上调与 13 个下调的 circRNA, 其中低表达的 hsa_circ_0089153 变化倍数最大 (FC=103.214); qRT-PCR 验证结果与基因芯片结果一致。hsa_circ_0089153 过表达后, ICC 细胞的增殖活性明显增强 [HCCC-9810: 过表达组 (114.816 ± 5.138) vs. 空载组 (100.000 ± 4.897), RBE: 过表达组 (117.235 ± 7.079) vs. 空载组 (100.000 ± 14.896) (均 P<0.05)]; 凋亡率明显降低 [HCCC-9810: 过表达组 (11.277 ± 0.243) vs. 空载组 (16.673 ± 0.660), RBE: 过表达组 (4.527 ± 0.301) vs. 空载组 (6.793 ± 0.534) (均 P<0.05)]; 迁移能力与侵袭能力明显增强 [HCCC-9810: 过表达组 (9.070 ± 1.090) vs. 空载组 (6.206 ± 1.197), RBE: 过表达组 (6.197 ± 0.687) vs. 空载组 (4.198 ± 1.170) (均 P<0.05) 与 HCCC-9810: 过表达组 (0.370 ± 0.026) vs. 空载组 (0.274 ± 0.014), RBE: 过表达组 (0.297 ± 0.016) vs. 空载组 (0.250 ± 0.019) (均 P<0.05)]。

结论: ICC 中存在多种差异表达的 circRNA, 其中 hsa_circ_0089153 在 ICC 组织中呈明显低表达, 但与多数情况不同, hsa_circ_0089153 过表达对 ICC 的恶性生物学行为有促进作用, 因此, hsa_circ_0089153 在 ICC 中的生物学功能及其关联的调控网络仍需进一步探讨。

关键词

胆管肿瘤; 胆管, 肝内; RNA, 环状; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.8

Expression of hsa_circ_0089153 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its biological function

CHEN Xiaobin^{1,2}, WU Jiayi^{1,3}, HUANG Liming^{1,3}, BAI Yannan^{1,3}, TANG Zhong², YAN Maolin^{1,3}

(1. Shengli Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Department of General Surgery, Nanping

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01244); 福建省卫生计生委医学创新课题基金资助项目 (2018-CX-8)。

收稿日期: 2021-06-25; **修订日期:** 2021-08-28。

作者简介: 陈小彬, 福建医科大学省立临床医学院硕士研究生/福建省南平市第一医院副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 严茂林, Email: yanmaolin74@163.com

First Hospital, Nanping, Fujian 353000, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

Abstract

Background and Aims: After hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is the second most common malignant tumor of the liver, with an insidious onset, high malignant level, and a unfavorable prognosis. Although aberrant circRNA expression is linked to the onset and progression of several malignant tumors, the association between circRNA and ICC is rarely investigated. As a result, this study was conducted as a preliminary test to examine circRNA's differential expression in ICC and its biological function.

Methods: By using high-throughput circRNA chip technology, five specimens of ICC patients confirmed by pathology in Fujian Provincial Hospital were used to screen out differentially expressed circRNA in ICC and corresponding adjacent tissues, and the circRNA with the most obvious change was selected from 500-1500 bp in length and verified by qRT-PCR. The circRNA was then overexpressed in HCCC-9810 and RBE cell lines using lentivirus, and the impact of the circRNA on the biological function of ICC cells was investigated using CCK-8, scratch, Transwell, and flow cytometry.

Results: Compared with normal tissues adjacent to cancer, there are 76 differentially expressed circRNAs in ICC, including 63 upregulated and 13 downregulated circRNAs. The downregulated hsa_circ_0089153 had a highest fold-change (FC=103.214). The results of qRT-PCR were consistent with those of gene chip. After hsa_circ_0089153 overexpression, the proliferation activity of ICC cells significantly increased [HCCC-9810: over-expression group (114.816±5.138) vs. no-load group (100.000±4.897), RBE: over-expression group (117.235±7.079) vs. no-load group (100.000±14.896) (all $P<0.05$)]. The apoptosis rate significantly decreased [HCCC-9810: over-expression group (11.277±0.243) vs. no-load group (16.673±0.660) (all $P<0.05$)]. The migrated and invasive ability significantly increased [HCCC-9810: over-expression group (9.070±1.090) vs. no-load group (6.206±1.197), RBE: over-expression group (6.197±0.687) vs. no-load group (4.198±1.170) (all $P<0.05$) and HCCC-9810: over-expression group (0.370±0.026) vs. no-load group (0.274±0.014), RBE: over-expression group (0.297±0.016) vs. no-load group (0.250±0.019) (all $P<0.05$)].

Conclusion: There are a number of aberrantly expressed circRNAs in ICC, among which hsa_circ_0089153 has a noteworthy low expression. However, unlike most circumstances, overexpression of hsa_circ_0089153 can promote the malignant biological behavior of ICC cells. So, the biological role of hsa_circ_0089153 in ICC and the associated regulatory network still need to be further clarified.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Bile Ducts, Intrahepatic; RNA, Circular; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.8

肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是仅次于肝细胞癌的第二大肝脏恶性肿瘤^[1-2]。外科手术是目前治疗 ICC 最为积极有效的手段^[3]。由于 ICC 缺乏特征性症状, 难以早期诊断, 80%~90% 的患者确诊时已属晚期, 失去了根治性手术切除的机会, 绝大多数患者在 3~6 个月后死亡^[4]。ICC 患者切除术后总体生存率及中位生存时间仍不理想, 病灶多发、血管浸润、淋巴结转移、远处转移、低分化、CA19-9≥37 U/mL 是影响 ICC 患者远期预后的独立危险因素^[5]。根治性手术切除后总体 5 年生存率也低于 5%~10%^[6]。ICC 对放

化疗均不敏感^[7-8]。传统的治疗方法已无法提高患者的生存率, 因此探讨 ICC 的发生发展机制, 寻找新的治疗靶标及有效治疗手段迫在眉睫。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类环状非编码 RNA 分子, 通过特殊的选择性剪切方式产生, 由 1 个以上外显子或内含子构成^[9]。其具有表达多样性、稳定性相对好、高度保守及特异度显著等特征。circRNA 与肝细胞癌^[10-12]、胆囊癌^[13-14]、胰腺癌^[15-16]、结直肠癌^[17-18]、胃癌^[19-20]、食管癌^[21-22]、胆管细胞癌^[23-26]等消化系统肿瘤发生发展关系均有研究报道, 但 circRNA 与 ICC 发生发展关

系研究较少^[27-29]。

本研究通过检测 ICC 和对应癌旁组织的 circRNA 差异表达谱,挑选差异表达的 circRNA 进行体外细胞实验,探讨 circRNA 与 ICC 肿瘤生物学行为的关系。

1 材料与方 法

1.1 临床标本

收集福建省立医院经病理确诊的 5 例 ICC 患者标本,所取 ICC 组织及对应癌旁组织放进冻存管内,并储存于装有液氮的罐内,用于后续 RNA 提取。所有患者无合并其他恶性肿瘤史,同时没有经过药物、消融、放射或(和)TACE 等治疗,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 材料与试剂

核酸外切酶(RNase R,美国 Epicentre 公司),TRIzol RNA 提取试剂及 ds-cDNA 合成试剂(美国 Invitrogen 公司),RBE 细胞(BNCC100278,北纳生物),HCCC-9810 细胞(BNCC351917,北纳生物),CCK-8 法试剂盒(KGA317,凯基生物),过表达病毒/空载(中洪博元分子实验室),完全 RPMI-1640 培养基(KGM31800S,凯基生物),聚凝胺(H8761, Solarbio),结晶紫染色液(G1061, Solarbio),vector(Hanbio Biotechnology),DH5 α competent cell(TIANGEN, CB101-02),Trizol Reagent(CW0580S, CWBIO 康为世纪),HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(R223-01, Vazyme 诺唯赞),2 \times SYBR Green PCR Master Mix(A4004M, Lifeint 生命互联),荧光 PCR 仪[CFX Connect™实时,伯乐生命医学产品(上海)有限公司],多功能酶标仪(S/N502000011,TECAN),Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit(AP101-100-kit, MULTI SCIENCES 联科生物),NovoCyte™流式细胞仪[NovoCyte 2060R,艾森生物(杭州)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 样品总 RNA 提取与检测 分别从 5 例经病理确诊的 ICC 及相应癌旁组织中,运用 TRIzol RNA 提取试剂提取全部 RNA;并使用 Nanodrop ND-1000 在 230、260、280 nm 波长处分别测定 RNA 的吸光度值,确认 RNA 的浓度及纯度。通过甲醛变性琼脂糖凝胶电泳来验证 RNA 纯度及完整性。

1.3.2 ds-cDNA 合成、标记与杂交 使用 RNase R 除

去上述 RNA 质量检测合格样品中的线性 RNA,并使用 Super RNA Labeling 进行扩增和荧光标记,然后应用 Nanodrop ND-1000 检查荧光标记效率。RNA 样品标记完成后,使用 Agilent 公司生产的杂交系统和清洗液进行杂交排列及清洗。使用 Axon 4000B 基因芯片扫描仪扫描标本 Cy3 荧光强度,把结果输进 Axon GenePixPro 6.0 software,获得的 circRNA 数据经过 Fold Change 筛选,重新制作表达差异的 circRNA 数据。利用变化倍数(FC>2 倍)和 *t* 检验 *P* 值(<0.05)挑选 ICC 肿瘤组织与相应癌旁组织中差异表达的 circRNA,进一步提高条件:(1)FC>4 倍且 *P*<0.001;(2)每组的初始强度>300 以上;(3)每个 circRNA 的长度在 500~1 500 bp 之间,进行筛选。以 β -actin 为内参,将筛选出的 circRNA 在 5 对 ICC 组织及癌旁组织中行 qRT-PCR 验证。

1.3.3 hsa_circ_0089153 过表达载体并包装成慢病毒 查找基因序列,引入酶切位点,生物合成目的基因片段并连接到 pHBLV-CMV-circ-EF1-ZsGreen-T2A-Puro 载体上,质粒转化 DH5 α ,菌液扩大培养,去内毒素大提质粒,质粒酶切验证,37 $^{\circ}$ C,酶切 30 min,1%琼脂糖凝胶电泳分离条带质粒构建无误后并包装成慢病毒。

1.3.4 细胞转染 查找基因序列,引入酶切位点,生物合成目的基因片段并连接到 pHBLV-CMV-circ-EF1-ZsGreen-T2A-Puro 载体上,质粒转化 DH5 α ,菌液扩大培养,去内毒素大提质粒,质粒酶切验证,37 $^{\circ}$ C,酶切 30 min,1%琼脂糖凝胶电泳分离条带质粒构建无误后并包装成慢病毒。构建目的质粒,通过测序显示与目的序列一致。通过 1:1 500 的比率将聚凝胺加入培养基中,再按“每孔加病毒量(μ L)=MOI \times 细胞数/滴度(TU/mL) \times 1 000”公式计算每组所需病毒量,加入培养液中,混匀后加入孔中进行细胞感染。

1.3.5 PCR 验证转染效率 进行各组细胞 RNA 的提取,根据逆转录试剂盒将提取的 RNA 合成 cDNA,在荧光定量 PCR 仪上进行检测。引物全部由生物公司合成,其中 β -actin 为内参校准基因,引物序列: hsa_circ_0089153 正向 AAT CAC CCA GGA TAA CCC,长度 19 nt,反向 TCT GTC ACA GGC AAT TCA GC,长度 20 nt; β -actin 正向 TGG CAC CCA GCA CAA TGA A,长度 19 nt,反向 CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A,长度 25 nt。反应体系:1 μ L cDNA、0.4 μ L 上游引物、0.4 μ L 下游引物、

10 μL SYBR Green PCR Master Mix、8.2 μL RNase Free ddH₂O 共 20 μL 。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min（预变性），然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s（变性）、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s（退火）、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s（延伸），共 40 个循环。记录 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析，算出各组细胞中 hsa_circ_0089153 相对表达量。实验重复 3 次。

1.3.6 CCK-8 检测细胞增殖 根据实验需要将细胞进行稀释，将 100 μL 细胞悬液均匀铺到 96 孔板中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养箱内预培养 24 h；待细胞完全贴壁后进行实验，每孔加 10 μL CCK-8 检测试剂，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h；酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的 OD 值。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡 流式细胞仪进行检测。收集各处理组 $1\sim 3\times 10^6$ 个细胞，加 1 mL PBS 1 500 r/min 离心，3 min，洗两遍；用双蒸水将 $5\times$ Binding Buffer 稀释为 $1\times$ 结合缓冲液后，取 300 μL 预冷的 $1\times$ 结合缓冲液重悬细胞；每管加入 3 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI-PE，轻微混匀后，室温避光孵育 10 min；再向每管中加入 200 μL 预冷的 $1\times$ 结合缓冲液，混匀后上流式仪检测。

1.3.8 Transwell 实验 细胞转染成功后，将细胞消化液收集起来，离心，使用 DMEM 不完全培养基重悬细胞，计数，每个小室细胞数为： 3×10^4 个；在侵袭小室下室加入 500 μL 1640 完全培养基，上室细胞与无血清培养基总体积约 300 μL ；24 h 后染色，先将孔中的培养基去除，接着加入 PBS 清洗 5 min，然后将配制好的 0.1% 结晶紫加入并静置染色 1 h，用棉签擦去小室的内室细胞，在载玻片上将小室倒置进行拍照，拍照后去除孔中的染色液，将配制好的 33% 乙酸 1 mL 加入每个孔中溶解细胞中的染液，充分混匀静置后，每孔吸取 200 μL 置于 96 孔板中，用多功能酶标仪测定，波长为 570 nm，以每孔 200 μL 33% 乙酸作为对照，测定每孔中吸光值。

1.3.9 细胞划痕实验 细胞转染成功后，待细胞密度达到 90% 以上后进行划线，使用 200 μL 枪头在每孔进行划痕，弃去培养基，用 PBS 清洗 3 次，换成 1640 不完全培养基后给每孔划痕拍照；将细胞放入培养箱中，24 h 后再次给每孔的划痕拍照。根据划痕情况确定 24 h 划痕数据与 0 h 划痕数据，并求出对应的划痕宽度，进而计算出细胞的迁移速率。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。所有实验重复 3 次，定量结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用独立样本 t 检验行两组之间定量数值比

较，采用单因素方差分析行多组之间定量数值比较，采用 $S-N-K$ 法行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ ，统计图使用 GraphPad Prism6 绘制。

2 结果

2.1 ICC 组织和癌旁正常组织 circRNA 差异性表达分析

利用高通量 circRNA 芯片技术及生物信息学分析技术进行筛选，选择出 ICC 和对应癌旁组织有差异表达的 circRNA 总计 76 条，其中 ICC 相对癌旁组织有 63 条表达上调、13 条表达下调。提高条件后筛选出 10 条 circRNA，其中 8 条上调，2 条下调（hsa_circ_0048764、hsa_circ_0089153）。以 hsa_circ_0089153 倍数变化最明显（FC=103.214），其在 ICC 组织中的相对表达量（ 7.892 ± 1.067 ）明显低于癌旁正常组织（ 14.581 ± 0.737 ）（ $P<0.000 1$ ）。通过测定 RNA 的吸光度值及甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，证实得到的 RNA 质量和纯度可信，能进行后续实验。

2.2 qRT-PCR 验证结果

以 β -actin 为内参，通过将 hsa_circ_0089153 在 5 对 ICC 癌组织及癌旁组织进行 qRT-PCR 验证。根据 ΔCt 算法，在 ICC 癌组织中 hsa_circ_0089153 表达下调，与基因芯片筛查结果一致（图 1）。

2.3 细胞转染

进行目的病毒感染 72 h 后，通过荧光观察转染效率，结果显示，荧光显影满意，病毒转染良好（图 2）。

2.4 PCR 验证转染效率

将病毒转染成功的 HCCC-9810、RBE 细胞系进行 qRT-PCR 验证。在 HCCC-9810 和 RBE 细胞中过表达 hsa_circ_0089153 后，qRT-PCR 实验结果显示，过表达组 hsa_circ_0089153 相对表达量（HCCC-9810： 760.087 ± 148.931 ；RBE： 980.703 ± 191.103 ）明显高于对照组（HCCC-9810： 1.0 ± 0 ；RBE： 1.0 ± 0 ）（ $P<0.05$ ）和空载组（HCCC-9810： 1.38 ± 03.110 ；RBE： 1.061 ± 0.193 ）（ $P<0.05$ ），对照组与空载组差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）（图 3）。

2.5 CCK-8 检测细胞增殖

CCK-8 实验结果显示，hsa_circ_0089153 过表达慢病毒组（HCCC-9810： 114.816 ± 5.138 ；RBE： 117.235 ± 7.079 ）与空载组（HCCC-9810： 100.000 ± 4.897 ；RBE： 100.000 ± 14.896 ）相比，增殖能力明显升高（ $P<0.05$ ）（图 4）。

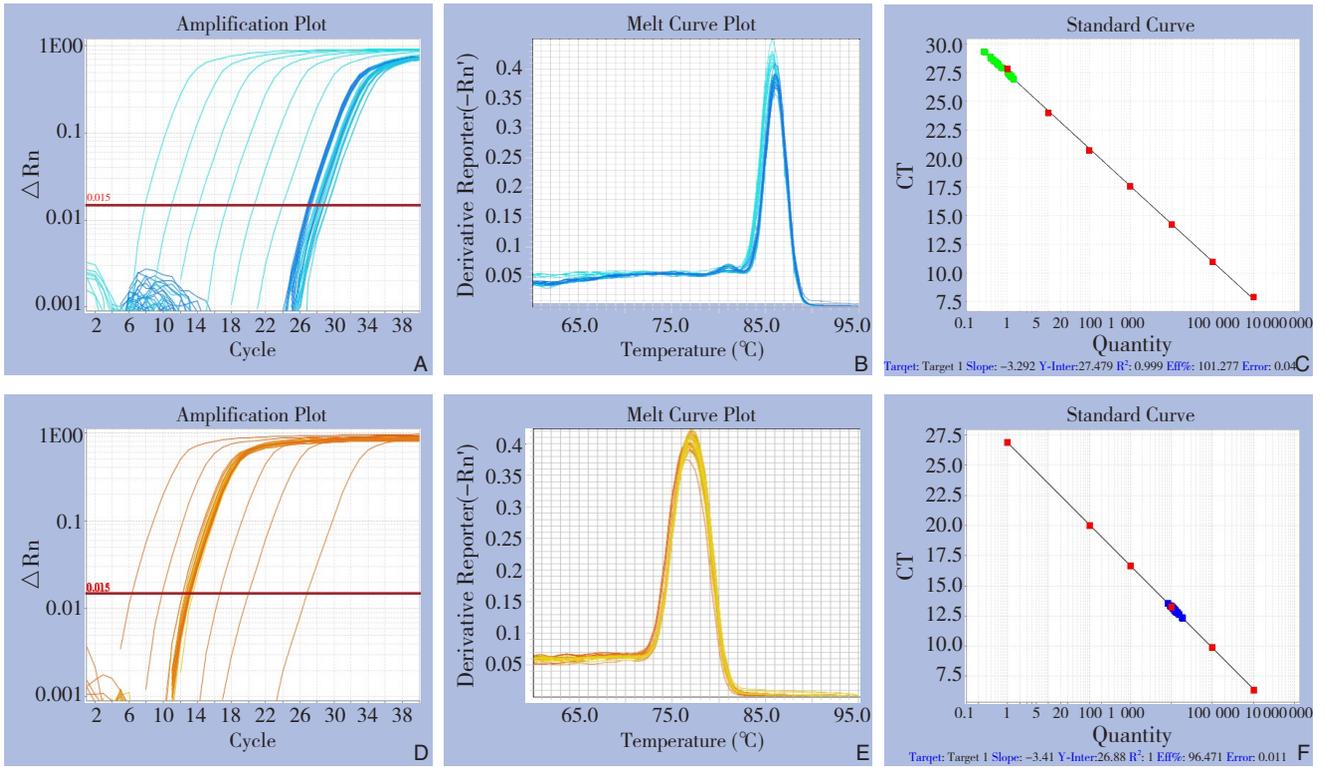


图1 qRT-PCR检测 circ_0089153 的表达 A: circ_0089153 扩增曲线; B: circ_0089153 溶解曲线; C: circ_0089153 标准曲线; D: β -actin 扩增曲线; E: β -actin 溶解曲线; F: β -actin 标准曲线

Figure 1 Detection of circ_0089153 expression by qRT-PCR A: Amplification curve of circ_0089153; B: Dissolution curve of circ_0089153; C: Standard curve circ_0089153; D: Amplification curve of β -actin; E: Dissolution curve of β -actin; F: Standard curve of β -actin

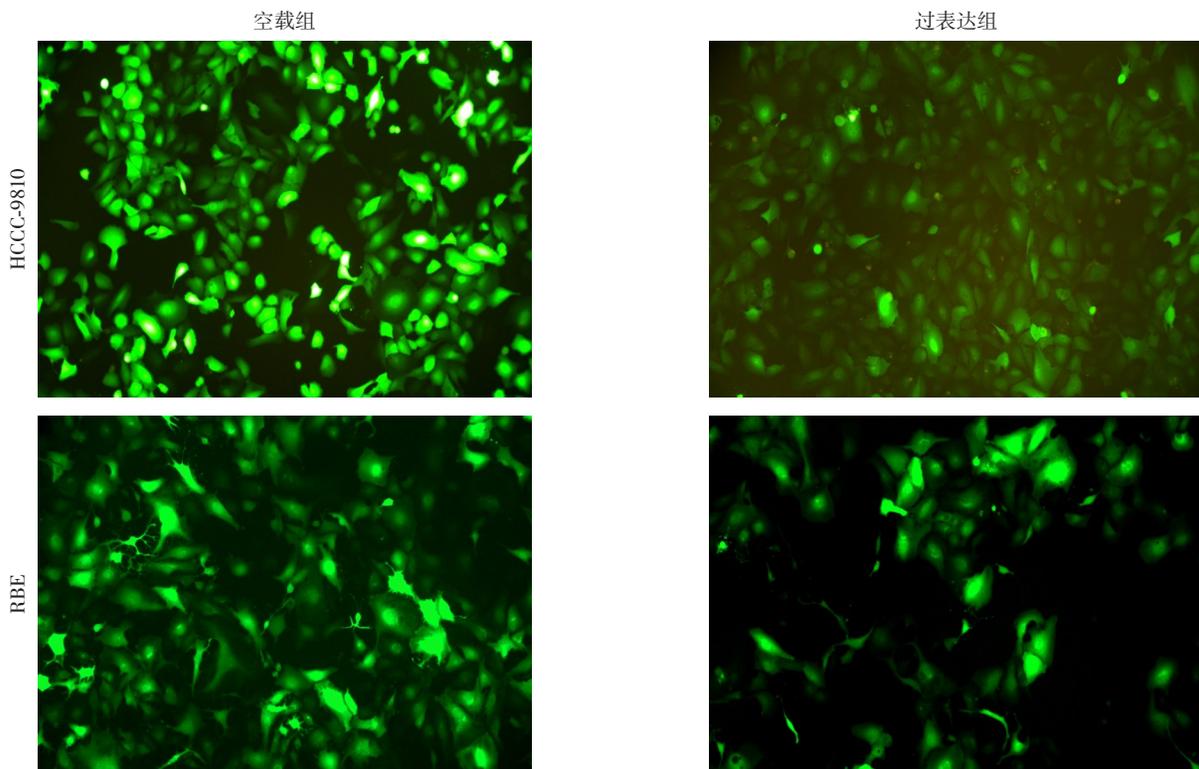


图2 荧光观察转染效果 (×100)

Figure 2 Fluorescence staining for analysis of transfection effect (×100)

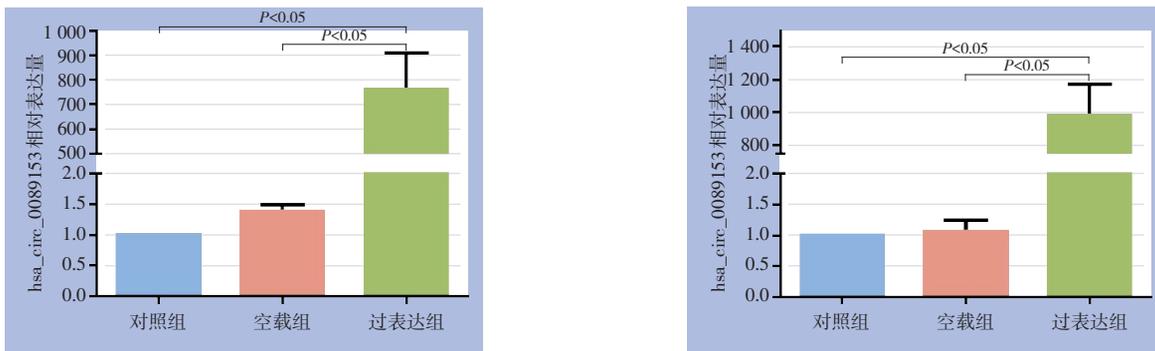


图3 PCR验证转染效率

Figure 3 Transfection efficiency verification by PCR

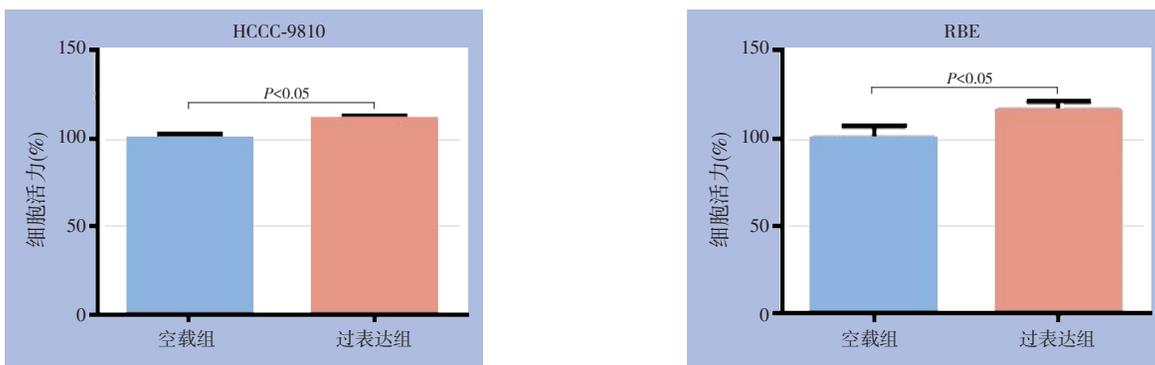


图4 CCK-8检测细胞增殖活性

Figure 4 Determination of cell proliferation by CCK-8 assay

2.6 细胞凋亡检测

流式细胞术检测结果显示，hsa_circ_0089153 过表达慢病毒组（HCCC-9810：11.277 ± 0.243；

RBE：4.527 ± 0.301）与空载组（HCCC-9810：16.673 ± 0.660；RBE：6.793 ± 0.534）比较，凋亡率明显降低（ $P < 0.05$ ）（图5）。

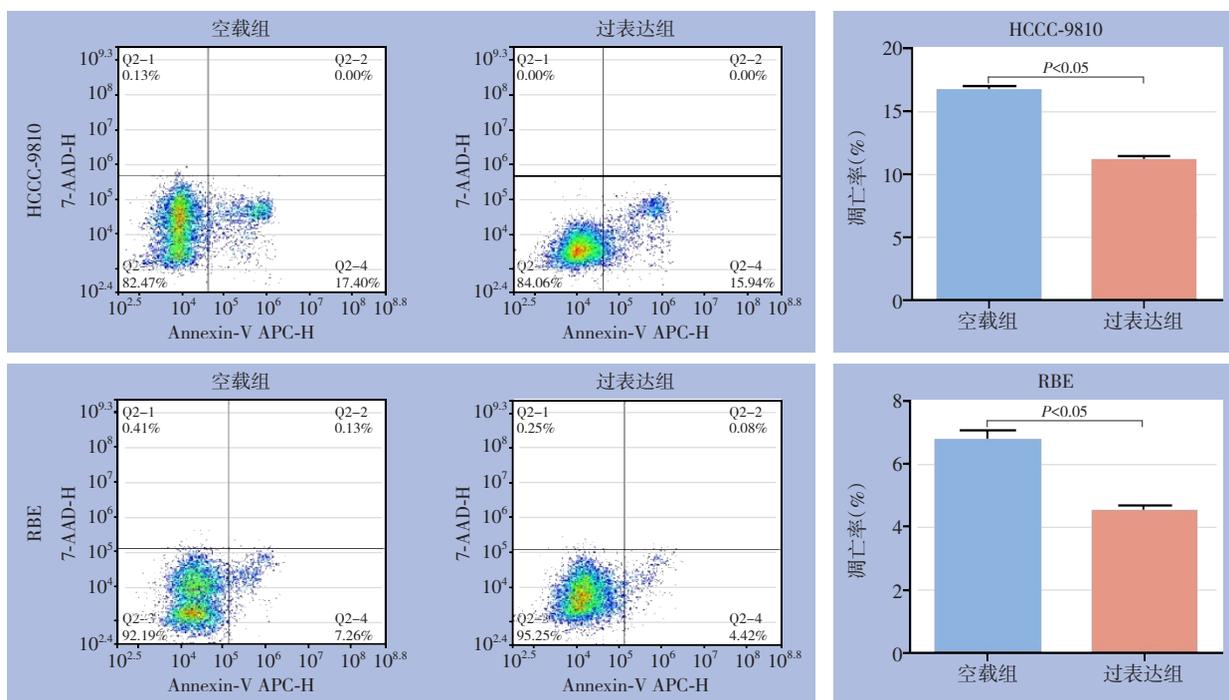


图5 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 5 Apoptosis analysis by flow cytometry

2.7 细胞划痕实验

细胞划痕实验检测结果显示, hsa_circ_0089153 过表达慢病毒组 (HCCC-9810: 9.070 ± 1.090 ; RBE: 6.197 ± 0.687) 与空载组 (HCCC-9810: 6.206 ± 1.197 ; RBE: 4.198 ± 1.170) 相比, 迁移能力增强 ($P < 0.05$) (图6)。

2.8 细胞侵袭实验

Transwell 实验检测结果显示, hsa_circ_0089153 过表达慢病毒组 (HCCC-9810: 0.370 ± 0.026 ; RBE: 0.297 ± 0.016) 后与空载组 (HCCC-9810: 0.274 ± 0.014 ; RBE: 0.250 ± 0.019) 相比, 侵袭能力增强 ($P < 0.05$) (图7)。

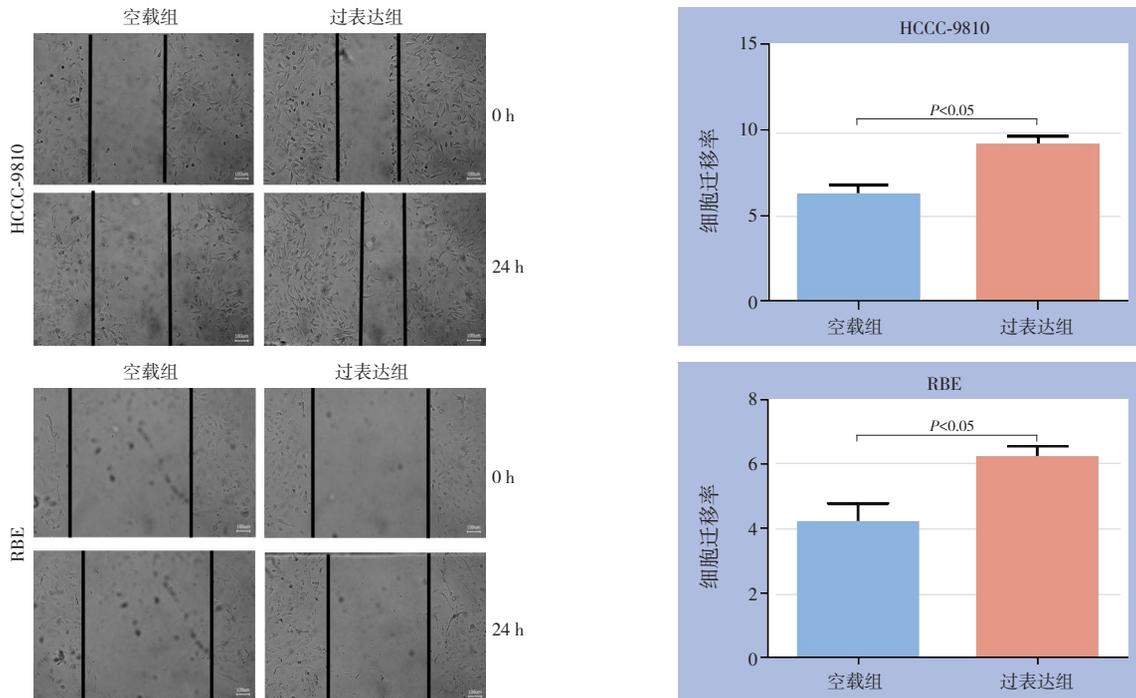


图6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

Figure 6 Cell migration ability examined by cell scratch assay

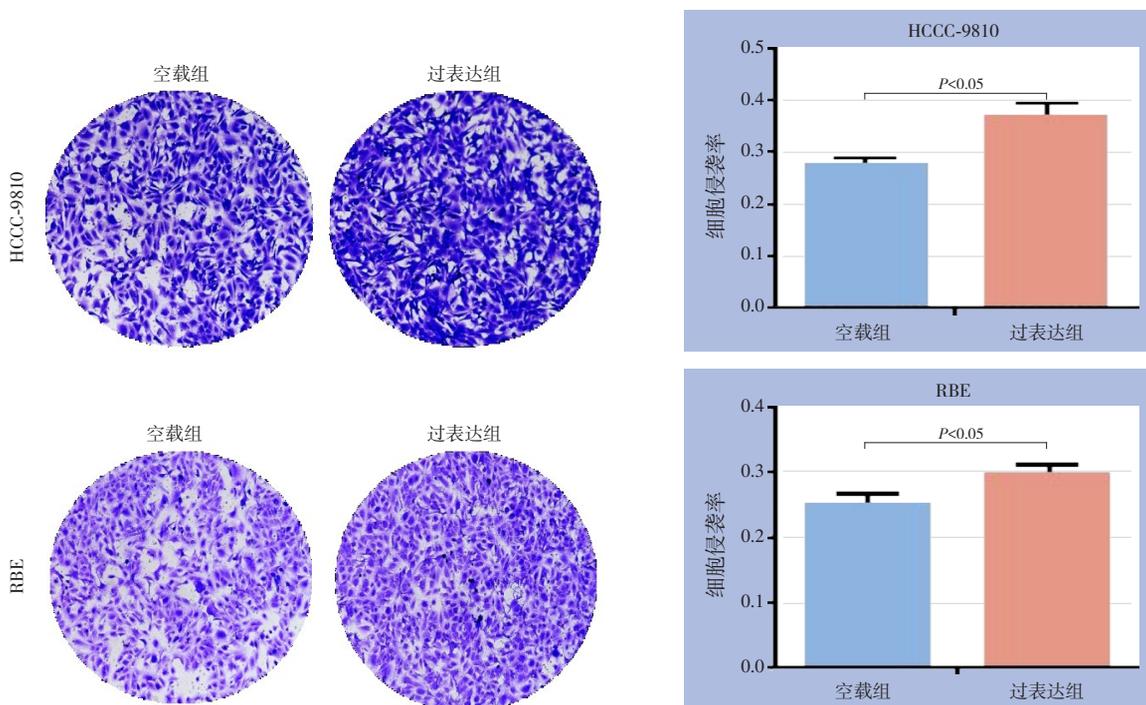


图7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

Figure 7 Cell invasion ability measured by Transwell assay

3 讨论

Moirangthem 等^[27]报道了 ICC 组织中 hsa_circ_002174 的表达较癌旁正常肝组织上调, 可以充当“海绵”来调节 miR-149 的表达, 从而调节 ICC 中的 Oct-2 和 IL-16 信号通路。Lu 等^[28]发现 hsa_circ_SMARCA 5 在 ICC 肿瘤组织中的表达低于癌旁组织, hsa_circ_SMARCA 5 表达与 T 分期、N 分期、TNM 分期、CA19-9 异常呈负相关, 高表达组 OS 明显高于低表达组; 在 tkf-1 和 hh-28 ICC 细胞中, hsa_circ_SMARCA 5 的上调抑制了顺铂和吉西他滨处理后的细胞增殖, 降低了细胞的相对活力, 并使顺铂和吉西他滨的半数抑制浓度 (IC₅₀) 下降, 促进化疗敏感性。陈秦俊杰^[29]研究发现 hsa_circ_ACTN4 在 ICC 中显著性高表达, 促进癌细胞的增殖、转移和侵袭。

本研究通过高通量 circRNA 芯片技术及生物信息学分析技术发现, hsa_circ_0089153 在 ICC 组织中表达明显下调, 并通过 qRT-PCR 验证了这一结果。随后, 本研究探讨了 hsa_circ_0089153 对 ICC 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭能力的影响。结果显示, 过表达 hsa_circ_0089153 基因后, 对 ICC 细胞的生长、迁移及侵袭能力有促进作用, 同时抑制 ICC 细胞的凋亡。该结果与以往研究^[20,30]发现的肿瘤中低表达 circRNA 多数呈抑癌作用不同, 但具体原因有待进一步探讨, 可能与不同种类肿瘤特性有关。当前关于 hsa_circ_0089153 研究较少, Liu 等^[31]通过应用 MAPK 通路验证了 hsa_circ_0089153/miR-608/EGFR、p53 轴在成釉细胞瘤进展中的作用, miR-608 与 hsa_circ_0089153 相结合后, 下游基因 EGFR 和 p53 共表达明显增强。Li 等^[32]发现 hsa_circ_0089153 (circNUP214) 通过吸附 miR-145 发挥“海绵”作用, 促进 ZEB2 在甲状腺乳头状癌中的表达, 促进细胞增殖、侵袭、迁移、和肿瘤发生。目前, circRNA 功能研究较多的是吸附 miRNA 发挥“海绵”作用, 进而调节靶基因的表达; 笔者推测 hsa_circ_0089153 也可能通过充当“海绵”吸附 miRNA 而参与 ICC 的发生发展, 故后续实验拟通过研究 circRNA/miRNA 轴来初步探讨 hsa_circ_0089153 在 ICC 中作用机制。

总之, 本研究基于前期发现 hsa_circ_0089153 在 ICC 中的低表达, 初步证明 hsa_circ_0089153 能促进 ICC 细胞的增殖与侵袭, 其机制有待于进一步探讨。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma[J]. *Lancet*, 2014, 383(9935):2168-2179. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61903-0.
- [2] Souche R, Addeo P, Oussoultzoglou E, et al. First and repeat liver resection for primary and recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Am J Surg*, 2016, 212(2): 221-229. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.07.016.
- [3] Farges O, Fuks D, Boleslawski E, et al. Influence of surgical margins on outcome in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: a multicenter study by the AFC-IHCC-2009 study group[J]. *Ann Surg*, 2011, 254(5): 824-830. doi: 10.1097/SLA.0b013e318236c21d.
- [4] de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(23):3140-3145. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6519.
- [5] 胡兴龙, 王胜智, 吴敏良, 等. 肝内胆管细胞癌患者术后的预后影响因素研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(3):377-382. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.03.017.
Hu XL, Wang SZ, Wu ML, et al. Analysis of prognostic factors for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma after operation[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2020, 29(3): 377-382. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.03.017.
- [6] Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6):1268-1289. doi: 10.1016/j.jhep.2014.01.021.
- [7] Lee J, Hong TH, Lee IS, et al. Comparison of the efficacy between gemcitabine-cisplatin and capecitabine-csplatn combination chemotherapy for advanced biliary tract cancer[J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(2):259-265. doi: 10.4143/crt.2013.230.
- [8] Hezel AF, Noel MS, Allen JN, et al. Phase II study of gemcitabine, oxaliplatin in combination with panitumumab in KRAS wild-type unresectable or metastatic biliary tract and gallbladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(3):430-436. doi: 10.1038/bjc.2014.343.
- [9] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2):141-157. doi: 10.1261/rna.035667.112.
- [10] Du Q, Han J, Gao S, et al. Hypoxia-induced circular RNA hsa_circ_0008450 accelerates hepatocellular cancer progression via the miR-431/AKAP1 axis[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 388. doi: 10.3892/ol.2020.12251.
- [11] Zhang J, Chang Y, Xu L, et al. Elevated expression of circular RNA circ_0008450 predicts dismal prognosis in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation, apoptosis, and invasion via sponging miR-548p[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9487-9494. doi: 10.1002/jcb.28224.

- [12] 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.
Gao PJ, Chen L, Gao J, et al. Differentially expressed circular RNAs in human hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(1): 65-69. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2017.01.011.
- [13] 满忠然, 庞青, 王勇, 等. 环状RNA001569表达与胆囊癌患者临床特征及预后的关系[J]. 牡丹江医学院学报, 2020, 41(5): 63-67.
Man ZR, Pang Q, Wang Y, et al. Expression of circular RNA 001569 in gallbladder carcinoma and its relation to clinicopathological features and prognosis[J]. Journal of Mudanjiang Medical University, 2020, 41(5): 63-67.
- [14] 王寿华. LncRNA H19、MINCR与circRNAFOXP1在胆囊癌作用及机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
Wang SH. Long noncoding RNA H19、MINCR and circular RNA FOXP1 promoted tumor progression in gallbladder cancer[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2017.
- [15] Xu Y, Yao Y, Gao P, et al. Upregulated circular RNA circ_0030235 predicts unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma and facilitates cell progression by sponging miR-1253 and miR-1294[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(1): 138-142. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.088.
- [16] An Y, Cai H, Zhang Y, et al. circZMYM2 competed endogenously with miR-335-5p to regulate JMJD2C in pancreatic cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5): 2224-2236. doi: 10.1159/000495868.
- [17] Jin Y, Yu LL, Zhang B, et al. Circular RNA hsa_circ_0000523 regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells as miRNA sponge[J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(12): e7811. doi: 10.1590/1414-431X20187811.
- [18] 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.
- [19] Zhao Q, Chen S, Li T, et al. Clinical values of circular RNA 0000181 in the screening of gastric cancer[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(4): e22333. doi: 10.1002/jcla.22333.
- [20] Zhang Y, Liu H, Li W, et al. CircRNA_100269 is downregulated in gastric cancer and suppresses tumor cell growth by targeting miR-630[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(6): 1585-1594. doi: 10.18632/aging.101254.
- [21] Wang Q, Zhang Q, Sun H, et al. Circ-TTC17 Promotes Proliferation and Migration of Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2019, 64(3): 751-758. doi: 10.1007/s10620-018-5382-z.
- [22] Su H, Lin F, Deng X, et al. Profiling and bioinformatics analyses reveal differential circular RNA expression in radioresistant esophageal cancer cells[J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 225. doi: 10.1186/s12967-016-0977-7.
- [23] Jiang XM, Li ZL, Li JL, et al. A novel prognostic biomarker for cholangiocarcinoma: circRNA Cdr1as[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(2): 365-371. doi: 10.26355/eurrev_201801_14182.
- [24] Xu Y, Yao Y, Zhong X, et al. Downregulated circular RNA hsa_circ_0001649 regulates proliferation, migration and invasion in cholangiocarcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2): 455-461. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.077.
- [25] Xu Y, Yao Y, Liu Y, et al. Elevation of circular RNA circ_0005230 facilitates cell growth and metastasis via sponging miR-1238 and miR-1299 in cholangiocarcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(7): 1907-1917. doi: 10.18632/aging.101872.
- [26] Louis C, Desotex M, Coulouarn C. Exosomal circRNAs: new players in the field of cholangiocarcinoma[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(21): 2239-2244. doi: 10.1042/CS20190940.
- [27] Moirangthem A, Wang X, Yan IK, et al. Network analyses-based identification of circular ribonucleic acid-related pathways in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Tumour Biol, 2018, 40(9): 1010428318795761. doi: 10.1177/1010428318795761.
- [28] Lu Q, Fang T. Circular RNA SMARCA5 correlates with favorable clinical tumor features and prognosis, and increases chemotherapy sensitivity in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Clin Lab Anal, 2020, 34(4): e23138. doi: 10.1002/jcla.23138.
- [29] 陈秦俊杰. 环状RNA ACTN4促进肝内胆管癌进展的机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
Chen QJJ. Mechanism of circ RNA ACTN4 promoting the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma[D]. Shanghai: Naval Medical University of the Chinese people's Liberation Army, 2021.
- [30] Zhang X, Zhou H, Jing W, et al. The Circular RNA hsa_circ_0001445 Regulates the Proliferation and Migration of Hepatocellular Carcinoma and May Serve as a Diagnostic Biomarker[J]. Dis Markers, 2018, 2018: 3073467. doi: 10.1155/2018/3073467.
- [31] Liu J, Qiao X, Liu J, et al. Identification of circ_0089153/miR-608/EGFR p53 axis in ameloblastoma via MAPK signaling pathway[J]. Oral Dis, 2021. doi: 10.1111/odi.13788. [Online ahead of print]
- [32] Li X, Tian Y, Hu Y, et al. CircNUP214 sponges miR-145 to promote the expression of ZEB2 in thyroid cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 507(1/4): 168-172. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.200.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陈小彬, 吴嘉艺, 黄理铭, 等. 肝内胆管细胞癌中 hsa_circ_0089153 的表达及其生物学功能[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(2): 199-207. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.008

Cite this article as: Chen XB, Wu JY, Huang LM, et al. Expression of hsa_circ_0089153 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its biological function[J]. Chin J Gen Surg, 2022, 31(2): 199-207. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.02.008