

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.02.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250123.0952.003\(2025-01-23\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250123.0952.003(2025-01-23))

circZNF652/miR-140-3p/HMGB1 通路对前列腺癌细胞增殖和迁移的影响及机制*

姜 华,张 贺,江松松

[遵义医科大学第五附属(珠海)医院/珠海市第六人民医院泌尿外科,广东珠海 519100]

[摘要] **目的** 探讨环状 RNA(circRNA)circZNF652 在前列腺癌(PCa)组织及 PCa 细胞系中的表达及其对增殖和迁移的影响和可能机制。**方法** 通过基因芯片技术检测在 PCa 和良性前列腺增生(BPH)患者血浆组织中差异表达的 circRNA。实时荧光定量 PCR(qPCR)测定 circZNF652 在 PCa 细胞系(22RV1、LNCaP、DU145、PC3)和正常前列腺上皮细胞(RWPE-1)中的表达情况。分析 circZNF652 不同表达水平与 PCa 患者总生存(OS)时间及临床病理特征的相关性。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)实验、克隆形成实验、Transwell 实验、细胞划痕实验、EdU 细胞增殖实验分析干扰 circZNF652 对 PCa 细胞增殖、克隆形成、侵袭和迁移能力的影响。在线数据库 TargetScan 预测 circZNF652 和 miR-140-3p 之间的结合位点,双荧光素酶报告基因实验, RNA pull-down 实验验证 circZNF652 和 miR-140-3p 的相互作用,并通过在 PC3 和 DU145 细胞中干扰 circZNF652,以及在 PCa 和 BPH 患者血浆中进一步验证;starBase2.0 预测 miR-140-3p 和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)之间的结合位点;在 PC3 和 DU145 细胞中检测过表达 miR-140-3p 后 HMGB1 表达水平变化。Western blot 检测 PCa、BPH 患者血浆,PC3、DU145、RWPE-1 细胞中 HMGB1 表达水平,双荧光素酶报告基因实验、RNA 免疫共沉淀(RIP)和 RNA pull-down 实验验证 miR-140-3p 和 HMGB1 的相互作用;并检测转染不同构建物(si-NC、si-circZNF652 #1、si-circZNF652 #1+inhibitor NC、si-circZNF652 #1+miR-140-3p inhibitor)后的 PC3 和 DU145 细胞中 HMGB1 的表达,以进一步证实 miR-140-3p 直接调控 HMGB1。**结果** 基因芯片技术及 qPCR 结果表明,PCa 患者血浆中 circZNF652 的表达水平较 BPH 患者升高,与低级别 PCa 和 BPH 患者比较,高级别 PCa 患者血浆中 circZNF652 表达水平上调($P<0.001$ 、 $P<0.01$)。和 RWPE-1 细胞比较,22RV1、LNCaP、DU145、PC3 细胞中 circZNF652 表达水平上调($P<0.05$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$);circZNF652 高表达的 PCa 患者 OS 时间较 circZNF652 低表达的 PCa 患者更短。临床病理特征分析显示,circZNF652 表达与 PCa 分期(T 分期和 N 分期)和 Gleason 评分相关。敲低 circZNF652 的表达可抑制 DU145、PC3 细胞增殖、侵袭和迁移。在线数据库 TargetScan 预测 circZNF652 与 miR-140-3p 具有互补序列,双荧光素酶报告基因实验及 RNA pull-down 实验证实 circZNF652 在 PCa 细胞中充当 miR-140-3p 的海绵;PC3 和 DU145 细胞中,干扰 circZNF652 实验也证明了这一点;miR-140-3p 在 PCa 患者血浆中的表达较 BPH 患者血浆明显降低($P<0.05$);PCa 患者中 miR-140-3p 表达水平与 circZNF652 表达水平呈负相关($r=-0.888$, $P<0.001$)。数据库 starBase2.0 分析结果显示,HMGB1 mRNA 3'-UTR 与 miR-140-3p 存在互补序列,miR-140-3p 的下游靶基因为 HMGB1。双荧光素酶报告基因实验、RIP 和 pull-down 实验证实了 miR-140-3p 与 HMGB1 之间直接结合。Western blot 实验发现过表达 miR-140-3p 导致 DU145、PC3 细胞中 HMGB1 表达水平降低。沉默 circZNF652 的表达导致 DU145 和 PC3 细胞中 HMGB1 表达水平下降,而抑制 miR-140-3p 则能逆转这种下降。**结论** circZNF652 的过表达可通过调控 miR-140-3p/HMGB1 通路促进 PCa 的进展和转移。

[关键词] circZNF652;miR-140-3p;高迁移率族蛋白 B1;前列腺癌

[中图法分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)02-0303-10

Effect and mechanism of circZNF652/miR-140-3p/HMGB1 pathway on cell proliferation and migration in prostate cancer*

JIANG Hua,ZHANG He,JIANG Songsong

(Department of Urologic Surgery,Fifth Affiliated Hospital (Zhuhai) of Zunyi Medical University/
Zhuhai Municipal Sixth People's Hospital,Zhuhai,Guangdong 519100,China)

* 基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515220218);贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 633);贵州省科技支撑计划(一般项目)(黔科合支撑[2023]一般 262);广东省医学科研基金项目(B2023140);遵义医科大学博士科研启动基金项目(BS2022-01)。

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of circZNF652 in prostatic cancer (PCa) tissues and PCa cell lines, and its impact and possible mechanism on proliferation and migration. **Methods** Differential expression of circRNAs in plasma tissues from PCa patients and benign prostatic hyperplasia (BPH) patients were detected by using gene chip technology. The expression levels of circZNF652 in PCa cell lines (22RV1, LNCaP, DU145, PC3) and normal prostate epithelial cells were measured by quantitative real-time PCR (qPCR). The correlation between different circZNF652 expression levels with the overall survival (OS) time and clinicopathological features of PCa patient were analyzed. The effects of interfering circZNF652 on PCa cell proliferation, colony formation, invasion and migration ability were assessed through CCK-8 assay, colony formation assay, Transwell assay, wound healing assay and EdU cell proliferation assay. The online database TargetScan was used to predict the binding sites between circZNF652 and miR-140-3p, and the dual-luciferase reporter gene assay and RNA pull-down assay confirmed the interaction of circZNF652 and miR-140-3p. This interaction was further validated in PC3 and DU145 cells by interfering circZNF652 as well as in blood samples from PCa and BPH patients. StarBase predicted the binding sites between miR-140-3p and HMGB1, and the HMGB1 expression levels were tested after miR-140-3p overexpression in PC3 and DU145 cells. Western blot was used to detect the HMGB1 expression levels in PCa and BPH patient, PCa cell lines (DU145, PC3) as well as RWPE-1 cells. The dual-luciferase reporter gene assay, RNA immunoprecipitation (RIP) and RNA pull-down were conducted to verified the interaction between miR-140-3p and HMGB1, and the HMGB1 expression in PC3 and DU145 cells were detected after transfecting different constructs (si-NC, si-circZNF652 # 1, si-circZNF652 # 1 + inhibitor NC, si-circZNF652 # 1 + miR-140-3p inhibitor) to further confirming that miR-140-3p directly regulates HMGB1. **Results** The gene chip and qRT-PCR results showed that the expression level of circZNF652 in the plasma of PCa patients was higher than that in BPH patients, compared with low-grade PCa and BPH patients, the plasma circZNF652 expression level in the patients with high grade PCa was upregulated ($P<0.001$, $P<0.01$). Compared with normal prostate epithelial cells, the expression levels of circZNF652 in 22RV1, LNCaP, DU145 and PC3 cell lines were upregulated ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$); The OS time in the PCa patients with circZNF652 high expression was shorter than that in PCa patients with circZNF652 low expression. Clinicopathological features analysis revealed that the circZNF652 expression was correlated with the PCa stage (T stage and N stage) and Gleason score. Knocking down circZNF652 expression inhibited the proliferation, invasion and migration in DU145 and PC3 cells. The online database TargetScan predicted that there was the complementary sequences between circZNF652 and miR-140-3p, and dual-luciferase reporter gene and RNA pull-down assays confirmed that circZNF652 acted as a sponge for miR-140-3p in PCa cells, interfering circZNF652 experiment in PC3 and DU145 cells also proved this point. The expression of miR-140-3p in the plasma of PCa patients was significantly decreased compared with BPH patients ($P<0.05$), and the expression level of miR-140-3p was negatively correlate with the expression level of circZNF652 ($r=-0.888$, $P<0.001$). The database StarBase analysis results showed that there are complementary sequences of HMGB1 mRNA 3'-UTR and miR-140-3p, and the downstream target gene of miR-140-3p was HMGB1. The dual-luciferase reporter gene, RIP and pull-down assays confirmed the direct binding between miR-140-3p and HMGB1. The Western blot experiment found overexpression of miR-140-3p resulted in the HMGB1 expression decrease in DU145 and PC3 cells. Silencing circZNF652 expression resulted in the decrease of HMGB1 protein levels in the DU145 and PC3 cells, while inhibiting miR-140-3p could reverse this decrease. **Conclusion** Overexpression of circZNF652 could promote the progression and metastasis of PCa by regulating the miR-140-3p/HMGB1 axis.

[Key words] circZNF652; miR-140-3p; HMGB1; prostate cancer

前列腺癌 (prostatic cancer, PCa) 是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,也是男性癌症相关死亡的第二大原因^[1-2]。它已成为老年男性健康的一大威胁。目前,对于晚期 PCa 的有效治疗方法有限。因此,深入理解驱动 PCa 发生、发展的分子机制,以期发现新的生物标志物,为治疗该疾病提供理论基础显得

至关重要。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 作为一种新型 RNA 分子,是真核生物中具有共价闭合结构的内源性生物分子。它们具有进化保守性,并表现出组织特异性和细胞类型特异性^[3]。近年来,越来越多的研究证据证实 circRNA 正成为肿瘤发展研究的新焦点^[4-6]。JU 等^[7]报道,一种新型内含子来源的

circGNG7, 可通过阻断热休克蛋白(heat shock protein, HSP)磷酸化, 通过 circGNG7/HSP27/应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)通路抑制头颈部鳞状细胞癌进展。circMYH9 通过调节丝氨酸/甘氨酸代谢及 p53 维持氧化还原稳态的方式促进结直肠癌进展^[8]。在肝细胞癌细胞中, m6A 修饰驱动 circMAP3K4 过表达, 编码出 circMAP3K4-455aa, 阻止肿瘤细胞因顺铂诱导的死亡^[9]。circZNF652 (位于染色体 17: 47388673-47389404) 是由 ZNF652 基因衍生的一种功能性 circRNA, 已被证实能调节 circRHOT1 的表达, 并通过促进 SMAD 同源物 5 (SMAD family member 5, SMAD5) 表达来调节膀胱癌的致癌特性^[10]。外泌体 circZNF652 已被证明能促进肝细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[11]。然而, circZNF652 在 PCa 中的功能尚不明确。本研究通过基因芯片技术分析比较了 PCa 患者和配对良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)患者血浆中的 circRNA 表达谱。通过细胞实验探索 circZNF652 在 PCa 发生中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床及病理资料

收集 2016 年 1 月至 2018 年 12 月期间在本院住院的 36 例 PCa 患者和同期住院手术的 25 例 BPH 患者; 按照 Gleason 评分系统将 PCa 分为 Gleason 评分 ≤ 6 分的低级别 PCa 20 例; Gleason 评分 ≥ 8 分的高级别 PCa 16 例。年龄 58~91 岁。纳入标准: (1) 初诊初治的原发性 PCa; (2) 接受 PCa 根治性切除术后经病理确诊或经前列腺穿刺活检确诊为 PCa; (3) 所有患者术前未接受体内/外放疗、化疗及抗雄激素治疗。所有参与者及其家属均签署了书面知情同意书。本研究获得本院伦理委员会批准(审批号: 2021ZH018)。

1.1.2 实验细胞、材料及仪器

PCa 细胞系 22Rv1、LNCaP、DU145 和 PC3 及正常上皮前列腺细胞 RWPE-1 购自中国科学院上海细胞库。TRIzol、Lipofectamine 2000 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; Prime Script RT 试剂盒和 SYBR Green Realtime PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; si-circZNF652 和对照序列(si-NC)均购自上海吉玛公司。高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1, 1: 3 000), GAPDH(1: 3 000)一抗抗体购自美国 Abcam 公司; EdU DNA 细胞增殖检测试剂盒、Apollo 染液、Giemsa 染液购自广州市锐博生物科技有限公司; 双荧光素酶活性检测试剂盒和转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司, Magna RNA 免

疫共沉淀(RNA Immunoprecipitation, RIP)试剂盒购自美国 Millipore 公司; 增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购自美国 Pierce Biotechnology 公司; 生物素标记蛋白 RNA pull-down 试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 circRNA 基因芯片分析

选取 4 例 PCa 患者和 4 例 BPH 患者的血浆样本, 采用 Arraystar Human circRNA Array v2 系统进行分析。每个样本的总 RNA 使用 NanoDrop ND-1000 进行定量。定量后, 按照 Arraystar 标准协议进行样品制备和微阵列杂交。首先, 用 Rnase R(美国 Epicentre 公司)消化总 RNA, 以消除线性 RNA 并富集 circRNA。随后, 富集的 circRNA 通过随机引物法使用 Arraystar Super RNA Labeling 试剂盒进行扩增和转录成荧光互补核糖核酸(complementary RNA, cRNA)。标记的 cRNA 随后被杂交到 Arraystar Human circRNA Array v2 系统(8×15 000)上。杂交后, 使用 Agilent Scanner G2505C 扫描阵列, 通过 Agilent Feature Extraction 11.0.1.1 软件对获取的阵列图像进行分析。使用 R 软件 limma 包进行分位数标准化及后续数据处理。筛选差异化表达最明显的前 20 个高表达和低表达的 circRNA 制作热图。以 circZNF652 表达中位数为界, 分为 circZNF652 高表达组和 circZNF652 低表达组。

1.2.2 细胞培养

所有细胞系用含 10% 胎牛血清 DMEM 细胞培养基于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中培养。每周消化传代 2 次。待细胞长至对数生长期时用于后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)

使用 TRIzol 试剂提取血浆或细胞总 RNA。通过 NanoDrop 2000 分光光度计读取 260 nm 处的吸光度 [$A_{(260)}$] 及 $A_{(280)}$ 以评估总 RNA 浓度和纯度, $A_{(260)}/A_{(280)}$ 比值在 1.8~2.1 范围内可用。然后, 用 PrimeScript 反转录试剂将所获 5 μ g RNA 反转录成互补 DNA(complementary DNA, cDNA)。qPCR 分析使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)在 ABI Prism 7500 Fast Real-time PCR 系统下进行。使用 GAPDH 基因作为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因 mRNA 表达水平。引物序列, circZNF652: 上游 5'-GGG CAC AAA CAG TTC ATG TG-3', 下游 5'-TGC GTT TGA ATG ATT TTC CA-3'; HMGB1: 上游 5'-AAA GCG GAC AAG GCC CGT TAT-3', 下游 5'-AAG AGG AAG AAG GCC GAA GGA G-3'; miR-140-3p: 上游 5'-TGC GGA TCA CAC AAA GGC AA-3', 下游 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AG-3'; GAPDH: 上游 5'-GGG AAG

CTC ACT GGC ATG GCC TTC C-3', 下游 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'。

1.2.4 细胞计数试剂盒-8(cell-counting kit-8, CCK-8)实验

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,进行消化、离心和计数。细胞以 1×10^4 /孔的细胞浓度接种于 96 孔细胞培养板中,分别孵育 0、24、48、72、96、120 h。每孔加入 100 μ L CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中孵育 2 h。随后,检测各孔 $A_{(450)}$ 值。

1.2.5 克隆形成实验

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,将细胞悬液以 1×10^3 /孔的细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养。定期观察细胞的生长情况和培养基的颜色变化。培养 14 d 左右后,4%多聚甲醛固定,0.5%结晶紫染色。显微镜计数细胞克隆数量。克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 Transwell 侵袭实验

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,用无血清培养基悬浮,接种于上室。下室添加包含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基作为化学引诱剂。在不同时间点,取出腔室内的细胞,用 4%多聚甲醛固定 10 min,随后用 Giemsa 染液染色。移除上室细胞,于显微镜下观察并使用 Image J 软件计数底层表面上的穿膜细胞数。

1.2.7 细胞划痕实验

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化成单细胞悬液,接种于 6 孔细胞培养板;37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养 24 h;第 2 天用 200 μ L 枪头垂直于培养板制造细胞线性划痕,然后磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗细胞 3 次,除去划下的细胞,加入无血清培养基,拍照。48 h 后再拍照,观察迁移的距离。图片使用 Image J 软件分析数据。

1.2.8 EdU 细胞增殖实验

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,接种于 96 孔细胞培养板中,加入含 EdU 培养基稀释液,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中孵育 2 h。4%多聚甲醛固定 20 min 后,用 Apollo 染液染色 30 min。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温下染核 30 min,拍照。

1.2.9 Western blot

细胞转染后,选取生长状态良好的细胞,裂解细胞,收集总蛋白。总蛋白通过 10% 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,然后转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,转膜条件为 300 mA 转膜 2 h。膜先用

HMGB1、GAPDH 一抗孵育,再用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。最后,使用 ECL 试剂盒显影、拍照。以条带灰度值计算 HMGB1 表达水平。

1.2.10 双荧光素酶报告基因实验

采用在线数据库 TargetScan 预测 circZNF652 潜在靶基因;starBase2.0 预测 miR-140-3p 潜在靶基因。细胞铺板,用 Lipofectamine 2000 转染。试剂的配制:1 $\times$ PLB(Passive Lysis Buffer)裂解缓冲液配制:由蒸馏水稀释 5 $\times$ PLB 裂解缓冲液制成。使用前将其取出,并于室温平衡 3 min。LAR II (Luciferase Assay Reagent II)配制:在 Luciferase Assay Substrate 中加 Luciferase Assay Buffer II,混合分装,-80 $^{\circ}$ C 避光保存。Stop & Glo Reagent 配制:Stop & Glo Buffer 置于恒温箱中,37 $^{\circ}$ C 平衡 20 min,再用其将 50 $\times$ Stop & Glo Substrate 稀释成 1 $\times$ Stop & Glo Reagent,现配现用。弃旧培养基,加入 PBS 洗涤(3 min/次,共 3 次),吸干残余液体。加 1 $\times$ PLB 裂解缓冲液(200 μ L/孔)至 24 孔细胞培养板中,室温摇床裂解 20 min。将细胞裂解液吸入 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液,移至新离心管中,标记待用。a:另取 1.5 mL 离心管,每管加入 100 μ L LAR II 和细胞裂解上清液(20 μ L),轻柔混匀。于检测仪中检测萤火虫荧光素酶反应强度。b:离心管取出,立即加入 100 μ L Stop&Glo Reagent,并小心混匀;再次置于检测仪中,检测内参海肾荧光素酶反应强度。双荧光素酶的活性比值=步骤 a 所测读数/步骤 b 测读数值。

1.2.11 RNA pull-down 实验

收集约 1×10^7 个细胞,并使用 Lipofectamine 2000 转染由生工生物工程(上海)股份有限公司合成生物素标记的 miR-140-3p(Bio-miR-140-3p 组)及其阴性对照(Bio-NC 组),进行裂解、超声处理。具体步骤:充分颠倒混匀链霉亲和素磁珠。加入 Binding Buffer 至最终体积约为 0.5 mL,重悬。置于磁力架上分离 30 s,去除上清液。加入 50 μ L 生物素标记并纯化的样品,颠倒混匀并于摇床摇动孵育 30 min。孵育结束后,置于磁力架上分离 1 min,收集上清液。使用 500 μ L Wash Buffer 重悬链霉亲和素磁珠。4 $^{\circ}$ C 摇床摇动孵育至少 1 h,不可涡旋混合。孵育结束后,置于磁力架上分离 1 h,收集上清液。使用 250 μ L Wash Buffer 重悬链霉亲和素磁珠,置于磁力架上分离 1 min,收集上清液。加入 50 μ L 的 Elution Buffer 重悬链霉亲和素磁珠,摇床缓慢摇动洗脱 5~10 min。置于磁力架上分离 1 min,收集洗脱液。洗脱液中立即加入 Neutralization Buffer。并通过 qPCR 检测。

1.2.12 RIP

磁珠准备:每根 Eppendorf 管加入 50 μ L 重悬后的磁珠悬液和 500 μ L RIP Wash Buffer,涡旋震荡后

置于磁力架上,左右转动 15°使磁珠吸附成一条直线,移去上清液,重复洗涤、震荡及吸附操作一次。抗体孵育:用 100 μ L 的 RIP Wash Buffer 重悬磁珠,加入约 5 μ g 相应抗体于每个样品中,室温孵育 30 min。孵育后,将含有磁珠的 Enpendoff 管置于磁力架上,弃上清液,加入 500 μ L RIP Wash Buffer,涡旋震荡后弃上清液,重复涡旋震荡一次,然后置于冰上。RNA 结合蛋白免疫沉淀:制备 RIP Immunoprecipitation Buffer,每根 Enpendoff 管加入 900 μ L RIP Immunoprecipitation Buffer。迅速解冻细胞裂解液。将 100 μ L 细胞裂解液的上清液和 900 μ L RIP Immunoprecipitation Buffer 在 4 $^{\circ}$ C 下旋转孵育过夜。孵育完后,短暂离心,将 Enpendoff 管放在磁力架上,弃上清液,加入 500 μ L RIP Wash Buffer,涡旋震荡后弃上清液,重复清洗 6 次。用 150 μ L Proteinase K Buffer 重悬磁珠-抗体复合物,55 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。孵育完后,将 Enpendoff 管置于磁力架上,将上清液吸入一新的 Enpendoff 管中。最后,将免疫共沉淀下来的 RNA 进行洗脱、纯化,并进行 qPCR 检测。

1.3 统计学处理

所有实验重复 3 次。采用 GraphPad Prism6.0 软件处理实验数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's *t* 检验或单因素方差分析(ANOVA)。采用 Pearson 相关性分析探究 miR-140-3p 与 HMGB1 水平的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circZNF652 在 PCa 患者血浆及细胞系中的高表达

4 例 PCa 患者和 4 例 BPH 患者血浆样本 R 软件生成的热图见图 1A。同 BPH 患者比较,circZNF652 表达水平在 PCa 患者血浆中升高。随后,qPCR 结果验证显示 circZNF652 在 PCa 患者血浆中表达水平较 BPH 患者明显升高,且与低级别 PCa 和 BPH 患者血浆比较,高级别 PCa 患者血浆中 circZNF652 明显升高($P < 0.05$),见图 1B;与 RWPE-1 细胞比较,circZNF652 在 PCa 细胞(22Rv1、LNCaP、DU145、PC3)中的表达水平明显升高($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$),其中在 DU145 和 PC3 细胞中升高最为明显,见图 1C,因此选择 DU145、PC3 细胞开展后续实验。另外 Kaplan-Meier 生存分析显示,相较于 circZNF652 低表达的 PCa 患者,circZNF652 高表达的 PCa 患者 OS 时间更短($P = 0.003$),见图 1D。临床病理数据分析进一步揭示了 circZNF652 表达水平与 PCa 肿瘤分期(T 分期和 N 分期)及 Gleason 评分相关($P < 0.05$),见表 1。

2.2 敲低 circZNF652 抑制 PCa 细胞生长、侵袭和迁移

qPCR 评估各干扰序列的干扰效率,最终选择 si-

circZNF652 # 1(si-circZNF652 # 1 组,干扰效率最高)进行后续实验,见图 2A。在 DU145 和 PC3 细胞中,CCK-8 实验、克隆形成实验、Transwell 实验和划痕愈合实验结果分别表明,与 si-NC 组(对照)比较,si-circZNF652 # 1 组细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭能力和迁移能力降低($P < 0.05$),见图 2B~E;且 EdU 细胞增殖实验结果表明,与 si-NC 组比较,DU145 细胞中 si-circZNF652 # 1 组 DNA 合成活动明显受到抑制($P < 0.05$),见图 2F。

表 1 PCa 患者 circZNF652 表达与临床病理特征的相关性[n(%)]

项目	n	circZNF652 表达		χ^2	P
		高表达	低表达		
分组				36.3	<0.01
BPH	25	2(8.0)	23(92.0)		
PCa	36	31(86.1)	5(13.9)		
年龄				0.8	>0.05
>72 岁	26	14(53.8)	12(46.2)		
≤72 岁	10	7(70.0)	3(30.0)		
T 分期				4.9	<0.05
>3 期	28	22(78.6)	6(21.4)		
≤3 期	8	3(16.7)	5(62.5)		
N 分期				3.9	<0.05
N0 期	28	10(35.7)	18(64.3)		
N1 期	8	6(76.9)	2(23.1)		
Gleason 评分					
>7 分	26	18(69.2)	8(30.8)	4.6	<0.05
≤7 分	10	3(30.0)	7(70.0)		

2.3 circZNF652 海绵样吸附 miR-140-3p

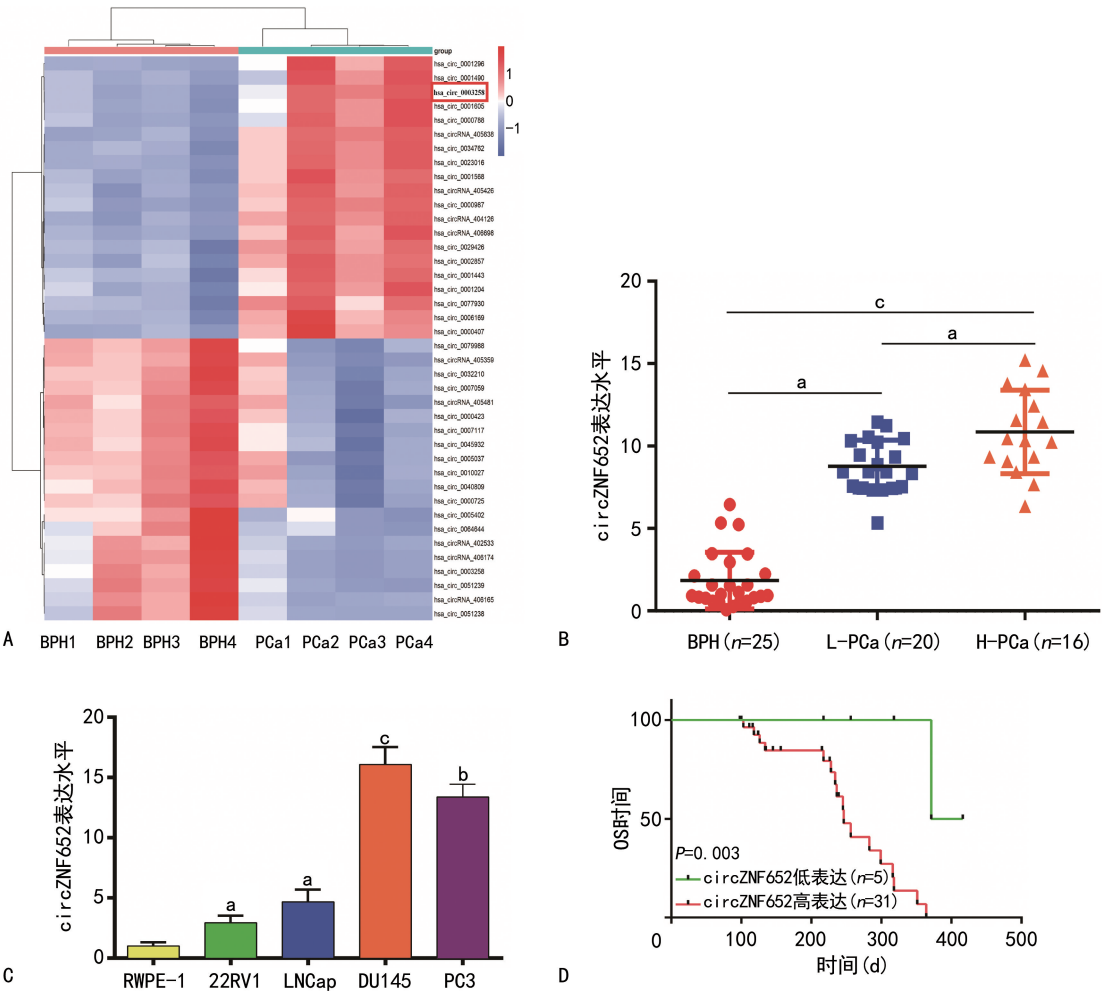
为了探索 circZNF652 调控 PCa 细胞生长的机制,使用在线数据库 TargetScan 预测潜在靶基因,发现微 RNA miR-140-3p 与 circZNF652 具有互补序列,见图 3A。双荧光素酶报告基因实验显示,在 DU145 和 PC3 细胞中,miR-140-3p 模拟物特异性地降低了野生型 circZNF652(circZNF652-WT)的荧光素酶活性,而对突变型 circZNF652(circZNF652-MUT)无影响,见图 3B。随后的 RNA pull-down 实验表明,在转染生物素标记的 miR-140-3p(Bio-miR-140-3p 组)或阴性对照(Bio-miR-NC 组)后的 PC3 和 DU145 细胞中,Bio-miR-140-3p 组的 circZNF652 富集率较 Bio-miR-NC 组明显上调($P < 0.05$),见图 3C。干扰 circZNF652 的表达后(si-circZNF652 # 1 组),si-circZNF652 # 1 组 miR-140-3p 的表达水平较 si-NC 组明显增多($P < 0.05$),见图 3D。此外,PCa 患者血浆中 miR-140-3p 的表达水平较 BPH 患者明显降低($P < 0.05$),见图 3E。Pearson 相关性分析显

示,在 PCa 患者血浆中,miR-140-3p 表达水平与 circ-ZNF652 表达水平呈负相关($r=-0.888,P<0.01$),见图 3F。这些结果表明,circZNF652 在 PCa 细胞中充当 miR-140-3p 的海绵,提示其在调节 PCa 生长中发挥作用。

2.4 HMGB1 是 miR-140-3p 在 PCa 细胞中下游分子

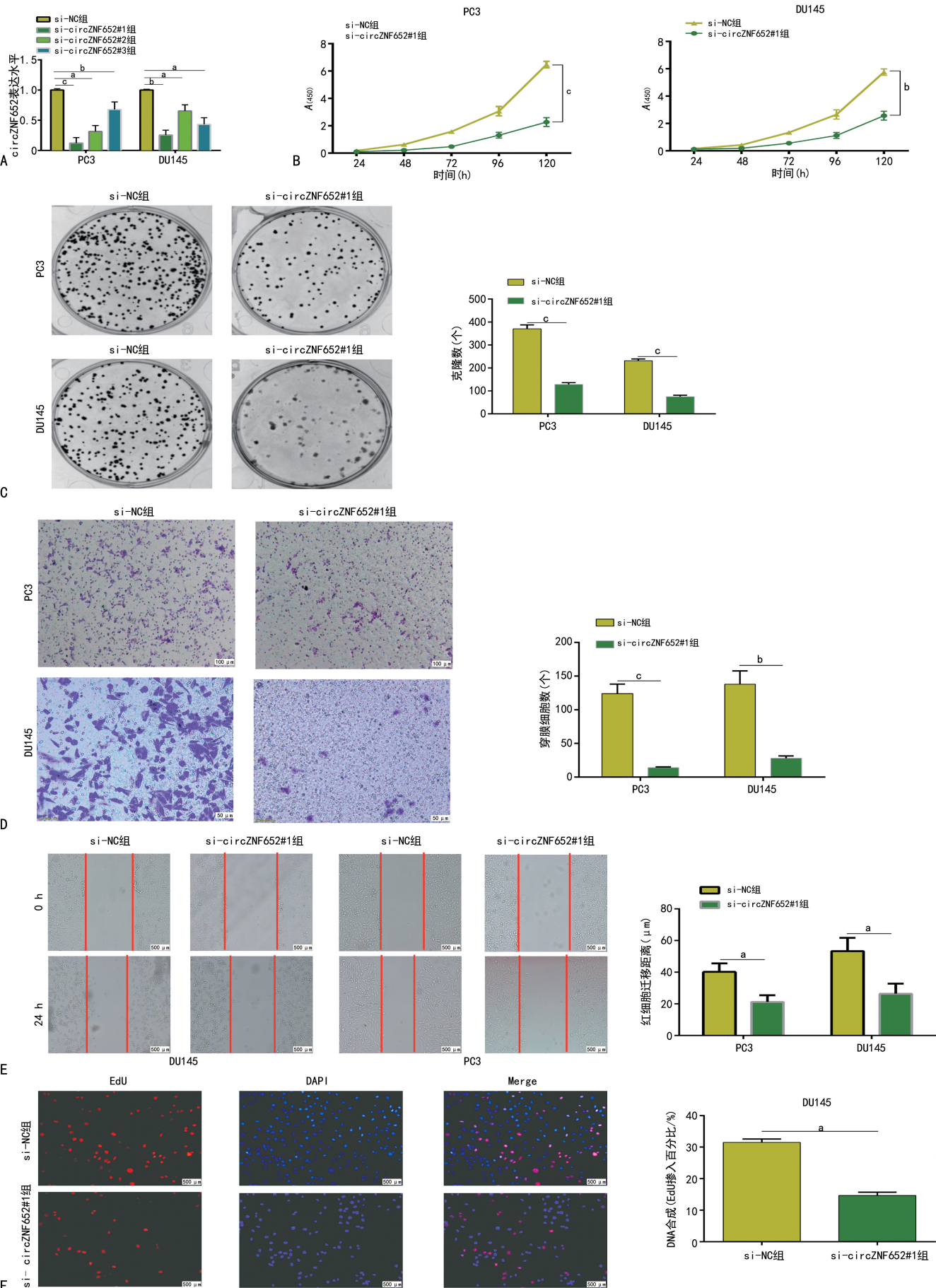
通过数据库 starBase2.0, HMGB1 被确认为 miR-140-3p 的潜在靶基因, HMGB1 mRNA 3'-UTR 与 miR-140-3p 存在互补序列,见图 4A。Western blot 实验结果表明,在 DU145 和 PC3 细胞中,过表达 miR-140-3p(miR-140-3p mimic 组)后, miR-140-3p 组 HMGB1 表达水平较 mimic NC 组(对照)降低,见图 4B。双荧光素酶报告基因实验显示,miR-140-3p 模拟物(miR-140-3p mimic)特异性地降低了 DU145 细胞中野生型 HMGB1(HMGB1 3'-UTR WT)的荧光素酶活性,但对突变型 HMGB1(HMGB1 3'-UTR MUT)无影响,见图 5A。此外,在 PC3 和 DU145 细

胞中,RIP 实验显示,与 anti-IgG 组(对照)比较, anti-Ago2 组的 miR-140-3p 和 HMGB1 mRNA 水平均增高,见图 5B。RNA pull-down 实验进一步支持这种相互作用,即 Bio-miR-140-3p WT 组 HMGB1 mRNA 富集率高于 Bio-NC 组(对照), $P<0.05$,见图 5C,证实了 miR-140-3p 与 HMGB1 直接结合。进一步实验发现,在高级别 PCa 患者组织中, HMGB1 mRNA 明显高于低级别 PCa 患者和 BPH 患者($P<0.05$),见图 5D,且 PC3、DU145 细胞中 HMGB1 表达水平明显高于 RWPE-1 细胞($P<0.05$),见图 5E。Pearson 相关性分析显示,PCa 患者血浆中 HMGB1 与 miR-140-3p 表达水平呈负相关关系($r=-0.820,P<0.001$),见图 5F。Western blot 实验表明,在 PC3 和 DU145 细胞中,沉默 circZNF652 可使 HMGB1 表达水平下降,而抑制 miR-140-3p 则能逆转这种下降,见图 5G。以上结果均证实 miR-140-3p 直接调控 HMGB1,且 circZNF652 通过作为 miR-140-3p 的海绵影响 HMGB1 表达。



A:基于基因芯片微阵列数据展示差异表达最明显的 circRNA;B;qPCR 检测 PCa 与 BPH 血浆中 circZNF652 的表达;C;qPCR 检测 PCa 细胞系(22RV1、C4-2、LNCaP、DU145、PC3)及 RWPE-1 细胞中 circZNF652 的表达;D:Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 circZNF652 表达水平患者 OS 时间分析。L-PCa:低级别 PCa;H-PCa:高级别 PCa。^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$;^c: $P<0.001$ 。

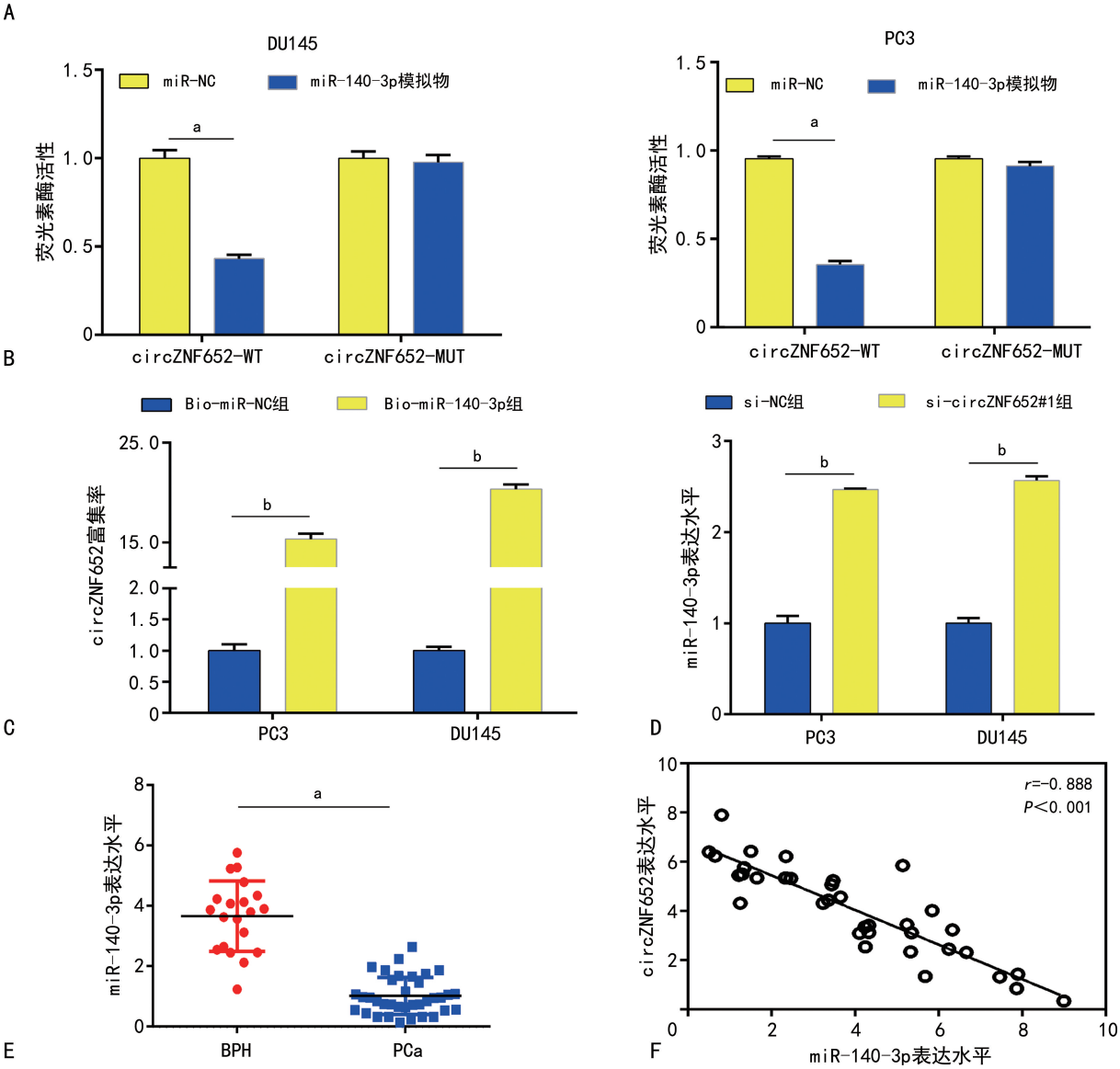
图 1 circZNF652 在 PCa 血浆及 PCa 细胞系中的表达情况



A:qPCR 检测 PC3 和 DU145 细胞中各 circZNF652 干扰序列的干扰效率;B:CCK-8 实验;C:克隆形成实验;D:Transwell 侵袭实验;E:细胞划痕愈合实验;F:EdU 细胞增殖实验。^a: $P<0.05$; ^b: $P<0.01$; ^c: $P<0.001$ 。

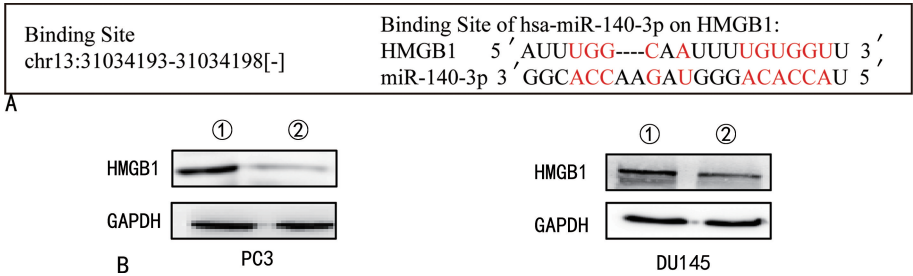
图 2 干扰 circZNF652 表达对 PCa 细胞体外增殖、侵袭和迁移的影响

wt-Hsa_circ_0003258: 5' CCACCCCAGUCCUU-CUGUGGUG 3'
miR-140-3p: 3' GGCACCAAGAUGGGACACCAU 5'
mut-Hsa_circ_0003258: 5' CCACCCCCAAGCCUUGACACCAG 3'



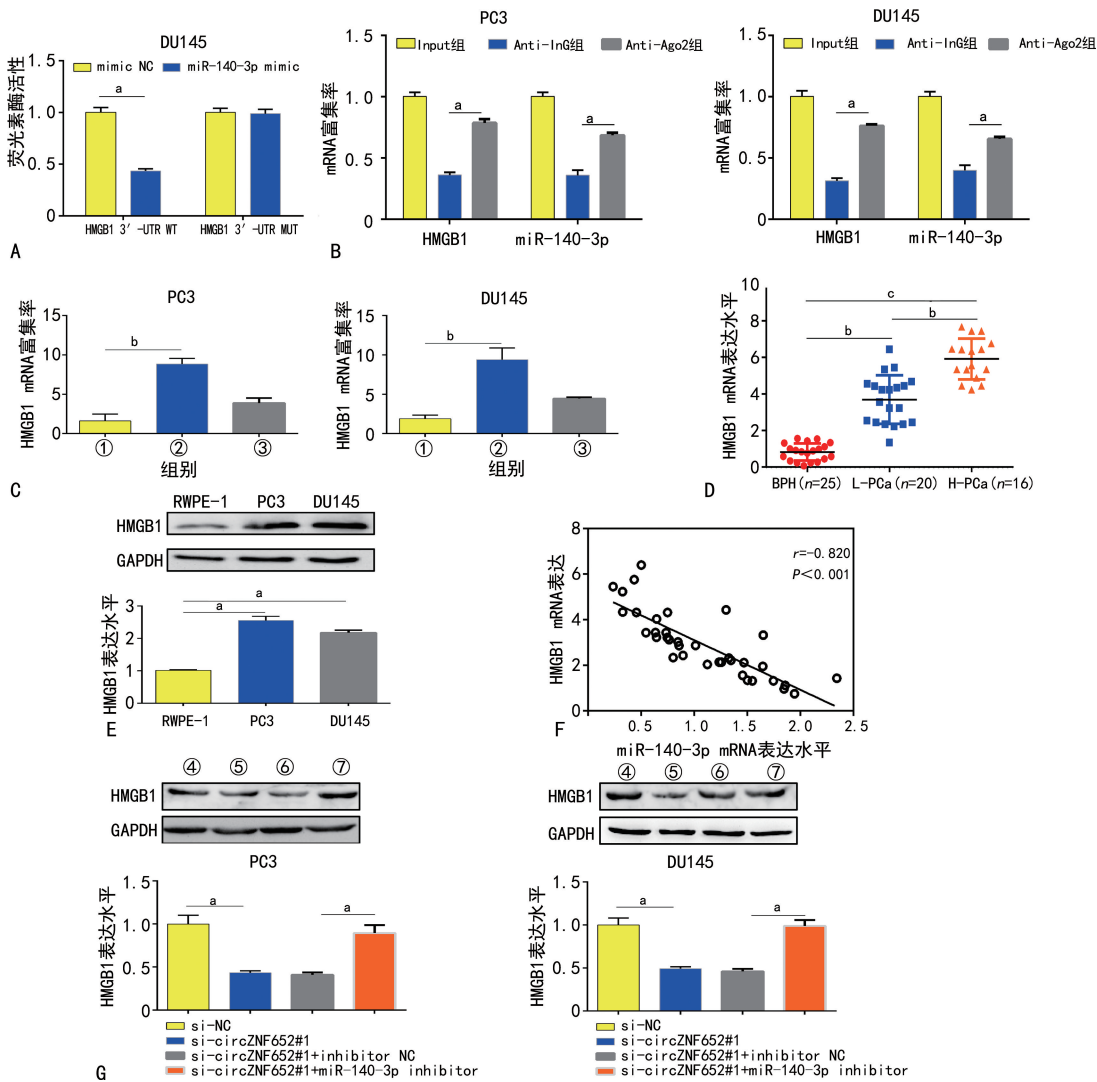
A: 在线数据库 Targetscan 预测 circZNF652 与 miR-140-3p 的潜在结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 circZNF652 与 miR-140-3p 存在相互作用; C: qPCR 检测 PC3 和 DU145 细胞中 Bio-miR-140-3p 组、Bio-miR-NC 组的 circZNF652 表达水平; D: qPCR 检测 PC3 和 DU145 细胞中 sh-circZNF652 #1 组和 sh-NC 组的 miR-140-3p 表达水平; E: qPCR 检测 PCa 与 BPH 患者血浆中 miR-140-3p 表达水平; F: Pearson 相关性分析评价 PCa 患者血浆 circZNF652 表达水平与 miR-140-3p 表达水平间的关系。^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$; ^c: $P < 0.001$ 。

图 3 circZNF652 能海绵样吸附 miR-140-3p



A: starBase2.0 确认 miR-140-3p 与 HMGB1 mRNA 3'-UTR 相互作用的潜在结合区域; B: Western blot 检测 miR-140-3p 组和 miR-NC 组的 HMGB1 表达水平。①: miR-NC 组; ②: miR-140-3p mimic 组。

图 4 miR-140-3p 下游靶基因预测



A: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-140-3p 与 HMGB1 之间存在相互作用; B: RIP 实验在 PC3 和 DU145 细胞中分析 HMGB1 转录本与 miR-140-3p 及 RNA 结合蛋白共沉淀情况; C: RNA pull-down 实验证明 HMGB1 与 miR-140-3p 间的物理相互作用; D: qPCR 检测 BPH、低级别 PCa 和高级别 PCa 患者血浆中 HMGB1 表达水平; E: Western blot 检测 PCa 细胞系 (PC3 和 DU145) 及 RWPE-1 细胞中 HMGB1 表达水平; F: Pearson 相关性分析 PCa 患者血浆中 miR-140-3p mRNA 表达水平与 HMGB1 mRNA 表达水平间的关系; G: Western blot 检测转染不同构建物 (si-NC、si-circZNF652 #1、si-circZNF652 #1 + inhibitor NC、si-circZNF652 #1 + miR-140-3p inhibitor) 后的 PC3 和 DU145 细胞中 HMGB1 表达谱。①: Bio-NC; ②: Bio-miR-140-3p WT; ③: Bio-miR-140-3p MUT; ④: si-NC; ⑤: si-circZNF652 #1; ⑥: si-circZNF652 #1 + inhibitor NC; ⑦: si-circZNF652 #1 + miR-140-3p inhibitor。L-PCa: 低级别 PCa; H-PCa: 高级别 PCa。^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$; ^c: $P < 0.001$ 。

图 5 circZNF652 可能通过 miR-140-3p 调控 HMGB1 的表达

3 讨 论

circRNA 是一种非编码 RNA, 主要存在于真核细胞中, 具有进化保守性, 并展现出组织特异性和细胞特异性^[12]。研究表明, circRNA 参与了基因转录、翻译和剪接等基本细胞生物过程, 并对各种疾病的发生、发展产生影响^[13-14]。本实验结果显示, 与 BPH 患者比较, PCa 患者血浆中 circZNF652 表达水平明显上调 ($P < 0.05$)。值得注意的是, 高级别 PCa 患者血浆中 circZNF652 的水平明显高于低级别 PCa 患者, circZNF652 的表达与 PCa 病理分期 (T 分期和 N 分期)、Gleason 评分相关, 既 circZNF652 表达越高, PCa 病理分期越高, PCa 组织分化越差, circZNF652 可能与 PCa 不良预后相关。此外, 同 circZNF652 低表达

组比较, 高表达组的 PCa 患者的 OS 时间更短。功能研究显示, 沉默 circZNF652 能有效抑制 PCa 细胞的增殖、克隆形成、侵袭和迁移能力。这些发现表明, circZNF652 可能是预防和治疗 PCa 的潜在治疗靶点, 同时也是基于血清的 PCa 诊断生物标志物的候选者。

HMGB1 属于高迁移率族超家族, 是哺乳动物细胞中常见的染色质成分, 参与炎症、创伤、恶性肿瘤和免疫系统疾病的发生、发展^[15-18]。研究已经证实 HMGB1 在多种恶性肿瘤组织中过度表达, 并通过调控多个信号通路参与肿瘤的侵袭、转移和药物抵抗, 因此被视为肿瘤识别的潜在生物标志物^[19-20]。有研究表明, HMGB1/晚期糖基化终产物 (receptor of ad-

vanced glycation endproducts, RAGE) 通路激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/丝氨酸/蛋白激酶 B (serine/threonine kinase, Akt) 通路, 进而促进胰腺癌细胞的增殖和进展^[21]。此外, HMGB1 与 BRG1 的相互作用也被证实能够促进 PCa 的增殖和转移^[22]。另一项研究揭示了 circ_0006646 通过靶向 miR-665/HMGB1 通路来促进胃癌进展^[23]。然而, 尽管已有这些发现, HMGB1 在 PCa 中的具体调控机制仍然不够清晰。本研究发现, 在高级别 PCa 患者血液中, HMGB1 的表达水平高于低级别 PCa 和 BPH 患者。PCa 患者组织中 HMGB1 与 miR-140-3p 表达水平呈现明显负相关关系。进一步机制研究揭示了 circZNF652/miR-140-3p/HMGB1 通路的存在, 并验证了 circZNF652 作为竞争性内源 RNA 与 miR-140-3p 相互作用, 上调 HMGB1 的表达水平, 从而控制 PCa 的进展并在其中发挥促癌作用。

综上所述, circZNF652 在 PCa 患者血浆中的表达水平明显升高, 其高表达与 PCa 患者的不良预后密切相关。circZNF652 通过促进 PCa 细胞的增殖、侵袭和迁移, 在 PCa 中发挥致癌作用。在机制上, circZNF652 作为内源竞争 RNA(competing endogenous RNAs, ceRNA) 与 miR-140-3p 相互作用, 导致 HMGB1 表达水平上调, 进而加速 PCa 的进展。

参考文献

[1] MAOMAO C, HE L, DIANQIN S, et al. Current cancer burden in China: epidemiology, etiology, and prevention [J]. *Cancer Biol Med*, 2022, 19(8): 1121-1138.

[2] YANG S, GUAN H, CHEN Z, et al. Analysis of the role of comprehensive treatment model in the treatment of prostate cancer [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 2118823.

[3] HUANG A, ZHENG H, WU Z, et al. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification [J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3503-3517.

[4] WEI X, SHI Y, DAI Z, et al. Underlying metastasis mechanism and clinical application of exosomal circular RNA in tumors (review) [J]. *Int J Oncol*, 2021, 58(3): 289-297.

[5] WANG C, LIU W R, TAN S, et al. Characterization of distinct circular RNA signatures in solid tumors [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 63.

[6] LI H, PENG K, YANG K, et al. Circular RNA

cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies [J]. *Theranostics*, 2022, 12(14): 6422-6436.

[7] JU H, HU Z, WEI D, et al. A novel intronic circular RNA, circGNG7, inhibits head and neck squamous cell carcinoma progression by blocking the phosphorylation of heat shock protein 27 at Ser78 and Ser82 [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(11): 1152-1172.

[8] LIU X, LIU Y, LIU Z, et al. CircMYH9 drives colorectal cancer growth by regulating serine metabolism and redox homeostasis in a p53-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 114.

[9] DUAN J L, CHEN W, XIE J J, et al. A novel peptide encoded by N6-methyladenosine modified circMAP3K4 prevents apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 93.

[10] KE H, ZHANG J, WANG F, et al. ZNF652-Induced circRHOT1 promotes SMAD5 expression to modulate tumorigenic properties and nature killer cell-mediated toxicity in bladder cancer via targeting miR-3666 [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 7608178.

[11] LI Y, ZANG H, ZHANG X, et al. Exosomal circZNF652 promotes cell proliferation, migration, invasion and glycolysis in hepatocellular carcinoma via miR-29a-3p/GUCD1 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 7739-7751.

[12] FENG X Y, ZHU S X, PU K J, et al. New insight into circRNAs: characterization, strategies, and biomedical applications [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2023, 12(1): 91.

[13] CHALBATANI G M, MOMENI S A, MOHAMMADI HADLOO M H, et al. Comprehensive analysis of ceRNA networks to determine genes related to prognosis, overall survival, and immune infiltration in clear cell renal carcinoma [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 141: 105043.

[14] FANG Z, JIANG C, LI S. The potential regulatory roles of circular RNAs in tumor immunology and immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 617583.

[15] YANG H, ZENG Q, SILVERMAN H A, et al. HMGB1 released from nociceptors mediates inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(33): 2102034118. (下转第 318 页)