

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.09.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220323.1730.002.html\(2022-03-24\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220323.1730.002.html(2022-03-24))沉默 circ_0081143 调控 miR-296-5p 抑制肾癌细胞
786-O 发生的作用研究*

邓春燕,熊蓓蓓,彭 玲,徐敬根

(四川省成都市双流区第一人民医院肿瘤科 610200)

[摘要] **目的** 探讨 circ_0081143 对肾癌细胞 786-O 的恶性生物学行为的影响及其分子机制。**方法** 选取 37 例肾癌组织及其癌旁组织,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 circ_0081143 和 miR-296-5p 的表达水平;将肾癌细胞 786-O 随机分为 si-circ_0081143 组、si-NC 组、miR-296-5p mimic 组、miR-NC 组、si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor 组;双荧光素酶报告实验检测 circ_0081143 和 miR-296-5p 的靶向关系;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞抑制率;克隆形成实验检测细胞克隆形成数;Transwell 小室法检测迁移细胞数;流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** 与癌旁组织相比,肾癌组织中 circ_0081143 表达水平升高,miR-296-5p 表达水平降低($P<0.05$)。沉默 circ_0081143 表达或过表达 miR-296-5p 后,786-O 细胞抑制率升高,克隆形成数和迁移细胞数减少,786-O 细胞凋亡率升高($P<0.05$)。抑制 miR-296-5p 表达逆转了沉默 circ_0081143 对 786-O 细胞的影响。**结论** circ_0081143 通过 miR-296-5p 调节肾癌细胞 786-O 的增殖、迁移及凋亡。

[关键词] circ_0081143;miR-296-5p;肾癌;增殖;迁移;凋亡**[中图法分类号]** R737.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)09-1463-05Study on effects of silencing circ_0081143 for regulating miR-296-5p
and inhibiting occurrence of renal cancer cell 786-O*

DENG Chunyan, XIONG Beibei, PENG Ling, XU Jinggen

(Department of Oncology, Shuangliu District First People's Hospital,
Chengdu, Sichuan 610200, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of circ_0081143 on the malignant biological behavior of renal cell carcinoma 786-O and its molecular mechanism. **Methods** Thirty-seven cases of kidney cancer tissues and paracancerous tissues were selected. The real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of circ_0081143 and miR-296-5p; the renal cancer cells 786-O were randomly divided into the si-circ_0081143 group, si-NC group, miR-296-5p mimic group, miR-NC group and si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor group; the dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between circ_0081143 and miR-296-5p; the tetramethylazolum salt colorimetric method (MTT) was used to detect the cell inhibition rate; the colony formation experiment was used to detect the number of cell clones formed; the Transwell chamber method was used to detect the number of migrated cells; the flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** Compared with paracancerous tissues, the expression level of circ_0081143 in renal cancer tissues was increased, and the expression level of miR-296-5p was decreased ($P<0.05$). After silencing circ_0081143 expression or overexpressing miR-296-5p, the inhibition rate of 786-O cells was increased, the number of colonies formed and the number of migrating cells were decreased, and the apoptosis rate of 786-O cells was increased ($P<0.05$). Inhibiting miR-296-5p expression reversed the effect of silencing circ_0081143 on 786-O cells. **Conclusion** circ_0081143 regulates the proliferation, migration and apoptosis of renal cancer cell 786-O through miR-296-5p.

[Key words] circ_0081143; miR-296-5p; renal cancer; proliferation; migration; apoptosis

肾癌是一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,易转移, 转移性肾癌占初诊肾癌的 20%~30%,迫切需要寻找

* 基金项目:四川省卫生和计划生育科研课题资助项目(16PJ223)。 作者简介:邓春燕(1987—),主治医师,硕士,主要从事肿瘤综合治疗。

新的靶点来诊断和治疗肾癌^[1-2]。miRNA 具有原癌基因或抑癌基因的作用,参与多种细胞生物学过程;circRNA 可竞争性吸附 miRNA,作为 miRNA 海绵参与多种基因的表达调控,在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[3-4]。研究报道 circ_001895 通过调控 miR-296-5p/SOX12 促进肾透明细胞癌进展^[5]。此外 miR-296-5p 可抑制食管鳞状细胞癌的肿瘤细胞的侵袭和迁移^[6]。敲除 circ_0000512 通过调节 miR-296-5p/RUNX1 轴抑制细胞增殖并促进结直肠癌细胞凋亡^[7]。Circular RNA Interactome 生物学软件预测发现 miR-296-5p 与 circ_0081143 有结合位点。circ_0081143 是由 COL1A2 剪切而成的 circRNA,位于 chr7:94044537-94055169;研究报道 circ_0081143 在胃癌组织中上调,circ_0081143 沉默抑制了胃癌发生并增强了胃癌细胞对顺铂的敏感性^[8]。circCOL1A2 沉默通过增强 miR-29b 的表达来抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的增殖、迁移、血管生成^[9]。而 circ_0081143 对肾癌细胞 786-O 生物学过程的影响尚不清楚。本实验旨在研究 circ_0081143 对肾癌细胞 786-O 生物学过程的影响及其机制是否与 miR-296-5p 有关。

1 材料与方法

1.1 材料

选取本院 2017 年 1 月至 2021 年 1 月 37 例肾透明细胞癌患者术中切除的肾癌组织及其配对癌旁正常组织,标本均经病理检查确诊,患者年龄 23~72 岁,平均(56.1±5.3)岁。患者术前未进行过放化疗,且对本研究均知情同意。

1.2 细胞与试剂材料

肾癌细胞 786-O 购自上海启达生物科技有限公司;RPMI-1640 培养基购自武汉益普生物科技有限公司;Trizol 试剂、荧光定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;MTT 试剂盒、凋亡检测试剂盒购自上海恒斐生物科技有限公司;Transwell 小室购自北京明阳科华生物科技有限公司;蛋白提取试剂盒购自艾美捷科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞处理与分组

肾癌细胞 786-O 常规培养于 RPMI-1640 培养基中,将 circ_0081143 小干扰 RNA1、2、3 转染 786-O 细胞后检测 circ_0081143 表达水平,选择表达水平最低的小干扰 RNA 用于后续试验。

将 circ_0081143 小干扰 RNA 及阴性对照、miR-296-5p 模拟物及阴性对照转染至 786-O 细胞,记为 si-circ_0081143 组、si-NC 组、miR-296-5p mimic 组、miR-NC 组;将 circ_0081143 小干扰 RNA 与 miR-296-5p 抑制剂共转染至 786-O 细胞,记为 si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor 组。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 circ_0081143 和 miR-296-5p 的表达水平

提取肾癌组织、癌旁组织及各组 786-O 细胞的总 RNA,合成 cDNA,按照试剂盒说明进行 PCR,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。以 GAPDH 和 U6 为内参,circ_0081143 上游引物序列:5'-GCAGGAGGTTTCGGCTA-AGT-3',下游引物序列:5'-GCAACAAAGTCCGCG-TATCC-3';GAPDH 上游引物序列:5'-CCTCAAGAT-CATCAGCAATGCCTC-3',下游引物序列:5'-GTG-GTCATGAGTCCTTCCACGATA-3';miR-296-5p 上游引物序列:5'-TGCCTAATTCAGAGGGTTGG-3',下游引物序列:5'-CTCCACTCCTGGCACACAG-3';U6 上游引物序列:5'-CTCGCTTCGCGCAGCACA-3',下游引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3.3 双荧光素酶报告实验

将 circ_0081143 野生型和突变型荧光素酶载体分别与 miR-NC 和 miR-296-5p 共转染至 786-O 细胞中,按照说明书检测荧光素酶活性。

1.3.4 MTT 检测细胞增殖抑制率

各组 786-O 细胞培养 48 h,每孔分别加入 MTT 溶液 20 μ L,孵育 4 h 后每孔加入二甲基亚砷 150 μ L,振荡反应 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度(OD)值。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.3.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成数

各组 786-O 细胞消化后制成细胞悬液,以每孔 100 个细胞接种于 6 孔板,培养 2 周出现肉眼可见克隆时终止培养,细胞清洗 2 遍后用甲醇固定 15 min,然后用结晶紫染色 30 min,低倍光学显微镜下计数大于 50 个细胞的集落。

1.3.6 Transwell 小室法检测迁移细胞数

将各组 786-O 细胞在无血清的培养液中饥饿 12 h,取 100 μ L 细胞悬液加入 Transwell 上室,培养 24 h,取出 Transwell 小室,甲醇固定 30 min,0.1%结晶紫染色 20 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,PBS 清洗 3 遍,风干后在显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞,并记数。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组 786-O 细胞,用预冷的 PBS 清洗 2 次,加入结合缓冲液重悬,再加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,混匀、避光孵育 10 min;上流式细胞仪检测。

1.3.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达

提取各组 786-O 细胞的总蛋白,经 SDS-PAGE 分离蛋白,转膜、封闭,加入 cleaved-caspase3 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入二抗室温孵育 2 h,曝光显影,定影,分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,符合正态

分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circ_0081143 和 miR-296-5p 在肾癌中的表达

与癌旁组织相比,肾癌组织中 circ_0081143 表达水平升高,miR-296-5p 表达水平降低($P < 0.05$),见表 1;circ_0081143 小干扰 RNA1、2、3 转染肾癌细胞 786-O 后 circ_0081143 表达水平均降低(1.00 ± 0.00 vs. $0.35 \pm 0.03/0.21 \pm 0.02/0.28 \pm 0.04$),差异有统计学意义($F = 1\,648.811, P < 0.05$)。

表 1 肾癌组织中 circ_0081143 和 miR-296-5p 表达的检测($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	circ_0081143	miR-296-5p
癌旁组织	37	0.86 ± 0.13	1.22 ± 0.15
肾癌组织	37	$2.19 \pm 0.33^*$	$0.56 \pm 0.10^*$
<i>t</i>		22.809	22.269
<i>P</i>		0.000	0.000

* : $P < 0.05$,与癌旁组织相比。

2.2 circ_0081143 和 miR-296-5p 靶向关系的验证

circ_0081143 和 miR-296-5p 有互补序列(图 1);miR-296-5p 与 circ_0081143 野生型报告质粒共转染后细胞荧光素酶活性降低($P < 0.05$);而 miR-296-5p 与 circ_0081143 突变型报告质粒共转染后细胞荧光素酶活性无显著变化(表 2)。si-circ_0081143 组

(1.00 ± 0.00) miR-296-5p 表达水平高于 si-NC 组(2.74 ± 0.19),差异有统计学意义($t = 27.474, P < 0.05$)。

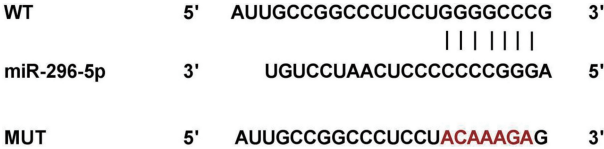


图 1 circ_0081143 和 miR-296-5p 的互补序列

表 2 双荧光素酶报告实验($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	WT	MUT
miR-NC	0.96 ± 0.07	1.01 ± 0.08
miR-296-5p	$0.41 \pm 0.05^*$	0.99 ± 0.07
<i>t</i>	19.181	0.564
<i>P</i>	0.000	0.580

* : $P < 0.05$,与 miR-NC 组比较。

2.3 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 增殖的影响

与 si-NC 组相比,si-circ_0081143 组 786-O 细胞抑制率升高,克隆形成数减少($P < 0.05$);与 miR-NC 组相比,miR-296-5p mimic 组 786-O 细胞抑制率升高,克隆形成数减少($P < 0.05$);与 si-circ_0081143 组相比,si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor 组 786-O 细胞抑制率降低,克隆形成数增加($P < 0.05$),见图 2,表 3。

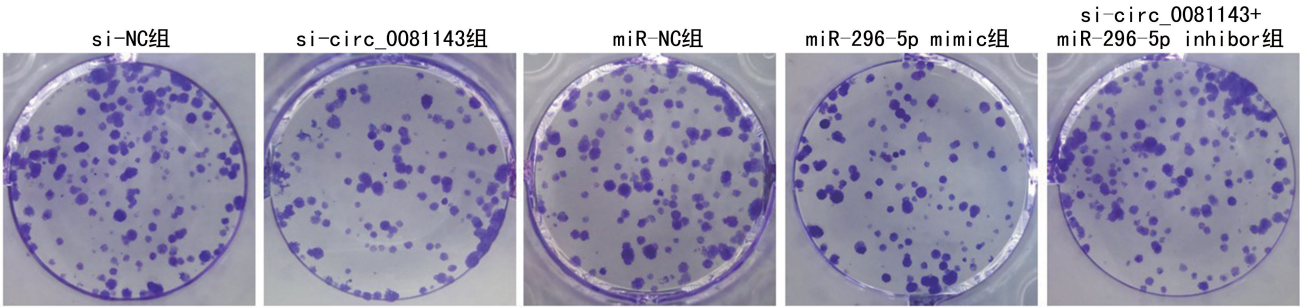


图 2 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 克隆形成的影响

表 3 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 细胞抑制率和克隆形成数的检测($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	抑制率(%)	克隆形成数(个)
si-NC	0.00 ± 0.00	107.75 ± 4.82
si-circ_0081143	$59.53 \pm 3.95^*$	$45.00 \pm 3.35^*$
miR-NC	0.06 ± 0.05	109.75 ± 5.17
miR-296-5p mimic	$45.71 \pm 3.59^\#$	$54.75 \pm 2.05^\#$
si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor	$25.13 \pm 1.84^\Delta$	$90.25 \pm 4.92^\Delta$
<i>F</i>	1 010.105	453.490
<i>P</i>	0.000	0.000

* : $P < 0.05$,与 si-NC 组比较;#: $P < 0.05$,与 miR-NC 组比较;△: $P < 0.05$,与 si-circ_0081143 组比较。

2.4 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 迁移的

影响

与 si-NC 组相比,si-circ_0081143 组 786-O 迁移细胞数减少[164.00 ± 6.71]个 vs. (64.50 ± 1.80)个],差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-NC 组相比,miR-296-5p mimic 组 786-O 细胞迁移细胞数减少[(167.63 ± 9.51)个 vs. (84.50 ± 2.4)个],差异有统计学意义($P < 0.05$);与 si-circ_0081143 组相比,si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor 组 786-O 迁移细胞数增加[(64.50 ± 1.80)个 vs. (140.63 ± 6.54)个],差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

2.5 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 凋亡的

影响

与 si-NC 组相比,si-circ_0081143 组 786-O 细胞

凋亡率及 cleaved-caspase3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 miR-NC 组相比, miR-296-5p mimic 组 786-O 细胞凋亡率及 cleaved-caspase3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 si-circ_0081143 组相比, si-circ_

0081143+miR-296-5p inhibitor 组 786-O 细胞凋亡率及 cleaved-caspase3 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 见图 4, 表 4。

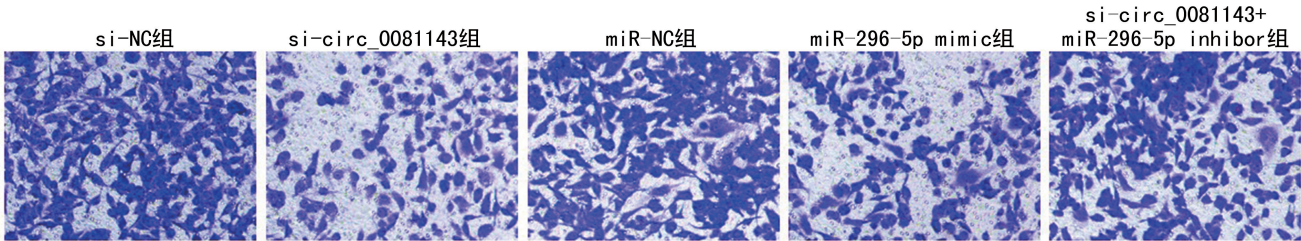
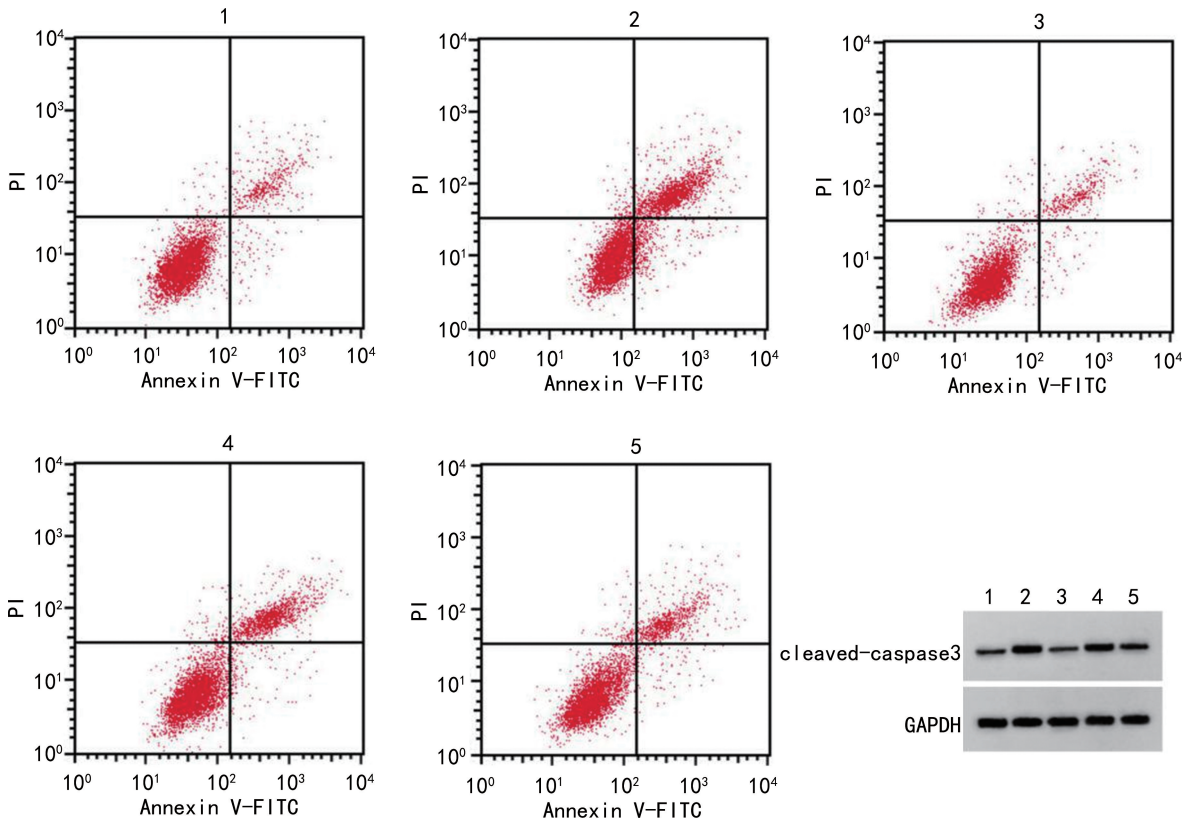


图 3 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 迁移细胞数的影响



A: circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 凋亡率的影响; B: circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 中 cleaved-caspase3 蛋白表达的影响。

图 4 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 凋亡的影响

表 4 circ_0081143 和 miR-296-5p 对 786-O 凋亡率及 cleaved-caspase3 蛋白表达的检测($\bar{x} \pm s, n=9$)		
组别	凋亡率(%)	cleaved-caspase3
si-NC	7.60±0.61	0.17±0.02
si-circ_0081143	23.83±1.21 [*]	0.66±0.06 [*]
miR-NC	7.75±1.04	0.19±0.02
miR-296-5p mimic	20.82±1.33 [#]	0.53±0.06 [#]
si-circ_0081143+miR-296-5p inhibitor	13.79±0.95 [△]	0.25±0.03 [△]
F	443.493	247.753
P	0.000	0.000

^{*}: $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; [#]: $P < 0.05$, 与 miR-NC 组比较; [△]: $P < 0.05$, 与 si-circ_0081143 组比较。

3 讨 论
靶向治疗在肾癌治疗中起重要作用,在肾癌的姑息性治疗和术前辅助治疗方面均获得了显著的疗效^[10]。因此,研究肾癌的发生发展机制寻找更多的靶点以开发新的靶向药物对肾癌治疗具有重要意义。研究表明 circRNA 参与调控肿瘤的发生发展过程,如敲低 circ_0081143 减轻了缺氧诱导的胃癌细胞迁移、侵袭和上皮/间质转化^[11]。为研究 circ_0081143 对肾癌细胞的影响,本实验先检测了肾癌组织中 circ_0081143 表达水平,结果显示,肾癌组织中 circ_0081143 高表达,提示 circ_0081143 可能在肾癌中起促癌作用。本实验进一步沉默 circ_0081143 后,786-O 细胞抑制率升高,克隆形成数和迁移细胞数减少,

786-O 细胞凋亡率升高,表明沉默 circ_0081143 可抑制 786-O 细胞增殖和迁移,并促进细胞凋亡。

研究报道 miR-296-5p 在乳头状甲状腺癌组织和细胞中的表达水平显著下调,miR-296-5p 模拟物可抑制乳头状甲状腺癌细胞增殖、抑制细胞克隆形成并诱导细胞凋亡^[12]。miR-296-5p 过表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[13]。本实验结果显示,肾癌组织中 miR-296-5p 表达水平降低,提示 miR-296-5p 可能在肾癌中起抑癌基因作用。且过表达 miR-296-5p 后,786-O 细胞抑制率升高,克隆形成数和迁移细胞数减少,786-O 细胞凋亡率升高;表明过表达 miR-296-5p 可抑制 786-O 细胞增殖和迁移,并促进细胞凋亡。

研究报道 circPLK1 敲低通过调节 miR-296-5p 抑制了三阴性乳腺癌体外细胞生长和侵袭及体内肿瘤的发生和转移^[14]。circ_0000515 通过调节 miR-296-5p/CXCL10 轴影响乳腺癌的进展^[15]。表明 circRNA 可通调控 miR-296-5p 影响肿瘤进展。本实验通过 Circular RNA Interactome 生物学软件预测发现 miR-296-5p 与 circ_0081143 有结合位点。且通过双荧光素酶报告实验证实 circ_0081143 可靶向调控 miR-296-5p,而抑制 miR-296-5p 表达逆转了沉默 circ_0081143 对 786-O 细胞的影响。

综上所述,沉默 circ_0081143 通过上调 miR-296-5p 抑制肾癌细胞 786-O 的增殖和迁移,促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] TSUCHIYA N. Molecular-targeted therapy in advanced renal cell carcinoma based on pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics; a proposed strategy[J]. *Int J Urol*, 2019, 26(1): 48-56.
- [2] 熊斌, 鲁伟. 转移性肾癌治疗的现状和进展[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2021, 42(4): 308-311.
- [3] HASHEMI A, GORJI-BAHRI G. MicroRNA: promising roles in cancer therapy [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(12): 1186-1203.
- [4] MA C, QIN J, ZHANG J, et al. Construction and analysis of circular RNA molecular regulatory networks in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 141-150.
- [5] CHEN Z, XIAO K, CHEN S, et al. CircRNA hsa_circ_001895 serves as a sponge of microRNA-296-5p to promote cell carcinoma progression via regulating SOX12 [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(2): 713-726.
- [6] WANG Z Z, LUO Y R, DU J, et al. MiR-296-5p inhibits cell invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma by downregulating STAT3 signaling [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5206-5214.
- [7] WANG L, WU H, CHU F, et al. Knockdown of circ_0000512 inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in colorectal cancer by regulating miR-296-5p/RUNX1 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 7357-7368.
- [8] XUE M, LI G, FANG X, et al. hsa_circ_0081143 promotes cisplatin resistance in gastric cancer by targeting miR-646/CDK6 pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 25.
- [9] ZOU J, LIU K C, WANG W P, et al. Circular RNA COL1A2 promotes angiogenesis via regulating miR-29b/VEGF axis in diabetic retinopathy [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117888.
- [10] 陈朝虎. 局部进展性肾癌术后靶向治疗的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(6): 450-455.
- [11] TANG J, ZHU H, LIN J, et al. Knockdown of Circ_0081143 mitigates hypoxia-induced migration, invasion, and EMT in gastric cancer cells through the miR-497-5p/EGFR axis [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, 36(4): 333-346.
- [12] ZHOU S L, TANG Q L, ZHOU S X, et al. MiR-296-5p suppresses papillary thyroid carcinoma cell growth via targeting PLK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2084-2091.
- [13] HUANG Y Z, ZHANG J, SHEN J J, et al. miRNA-296-5p functions as a potential tumor suppressor in human osteosarcoma by targeting SND1 [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(5): 564-572.
- [14] KONG Y, YANG L, WEI W, et al. CircPLK1 sponges miR-296-5p to facilitate triple-negative breast cancer progression [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(10): 1163-1176.
- [15] CAI F, FU W, TANG L, et al. Hsa_circ_0000515 is a novel circular RNA implicated in the development of breast cancer through its regulation of the microRNA-296-5p/CXCL10 axis [J]. *FEBS J*, 2021, 288(3): 861-883.