

· 论 著 ·

hsa_circRNA_0073762 促进甲状腺乳头状癌 细胞侵袭、转移和增殖的机制研究

贾恒哲, 张波林, 张杰, 吴振宇, 姜霞, 田延锋*

(河北医科大学第一医院普外科, 乳腺甲状腺诊疗中心, 河北石家庄 050031)

[摘要] 目的 探讨 hsa_circ_0073762 在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)中的调节作用, 揭示其具体作用机制。方法 采用高通量测序鉴定 PTC 与正常细胞差异表达环状 RNA(circRNA), 逆转录一定量聚合酶链式反应(reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)验证细胞系及 PTC 与癌旁组织差异表达, 核酸电泳、sanger 测序、RNA 酶消化实验验证其成环性及稳定性, 通过细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)、划痕愈合、克隆形成和迁移实验, 分析 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 双荧光素酶报告实验验证 hsa_circ_0073762、miR-548c-3p、ENAH 基因的相互作用。结果 RT-qPCR 验证测序结果显示, hsa_circ_0073762 在 PTC 细胞中显著上调($P < 0.001$), 且在癌组织中显著上调($P < 0.05$)。敲低 hsa_circ_0073762 可显著抑制 PTC 细胞的侵袭、转移和增殖能力。生物信息学预测和双荧光素酶报告实验表明 hsa_circ_0073762、miR-548c-3p、ENAH 构成 ceRNA 网络($P < 0.05$)。结论 hsa_circ_0073762 对 PTC 侵袭、转移和增殖进程存在影响, 可能成为 PTC 的新型诊断生物标志物和潜在治疗靶点。

[关键词] 甲状腺癌, 乳头状; RNA, 环状; 肿瘤浸润 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.04.012

[中图分类号] R736.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)04-0444-09

Mechanism of hsa_circRNA_0073762 in promoting invasion, metastasis, and proliferation of papillary thyroid carcinoma cells

JIA Heng-zhe, ZHANG Bo-lin, ZHANG Jie, WU Zhen-yu, JIANG Xia, TIAN Yan-feng*

(Department of General Surgery/Breast and Thyroid Diagnosis and Treatment Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory role of hsa_circ_0073762 in papillary thyroid carcinoma (PTC) and to explore its underlying mechanisms. **Methods** High-throughput sequencing was used to identify differentially expressed circular RNAs (circRNAs) in thyroid cancer and normal cells. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to validate the differential expression between cell lines, PTC, and adjacent tissues. Nucleic acid electrophoresis, sanger sequencing, and RNA enzyme digestion experiments were conducted to verify the circularity and stability of hsa_circ_0073762. Cell counting kit-8 (CCK-8), wound healing, clone formation, and migration assays were used to analyze the effects of hsa_circ_0073762 on PTC cell proliferation, migration, and invasion. A dual-luciferase reporter assay was used to validate the interaction between hsa_circ_0073762, miR-548c-3p, and the ENAH gene. **Results** RT-qPCR validation of sequencing results showed that hsa_circ_0073762 was significantly upregulated in PTC cells ($P < 0.001$) and in cancer tissues ($P < 0.05$).

[收稿日期]2025-01-02

[基金项目]河北省重点研发计划项目(21372401D)

[作者简介]贾恒哲(1998-),男,河北隆尧人,河北医科大学第

一医院医师,医学硕士,从事普外科疾病诊治研究。

* 通信作者。E-mail:18633889603@hebm.u.edu.cn

Knockdown of hsa_circ_0073762 significantly inhibited the invasion, migration, and proliferation of PTC cells. Bioinformatics prediction and dual-luciferase reporter assays indicated that hsa_circ_0073762, miR-548c-3p, and ENAH formed a ceRNA network ($P < 0.05$). **Conclusion** hsa_circ_0073762 has effects on the invasion, migration, and proliferation processes of PTC and may serve as a novel diagnostic biomarker and potential therapeutic target for PTC.

[Key words] thyroid cancer, papillary; RNA, circular; neoplasm invasiveness

甲状腺癌已成为全球发病率增长最快的恶性肿瘤之一,呈现出显著的上升趋势^[1]。在甲状腺癌中,甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)最为常见。尽管关于PTC的研究逐渐增多,但其确切的致病机制依然未被完全揭示,且与其相关的多种复杂因素尚待进一步探索。目前,已知的甲状腺癌危险因素包括接触电离辐射、代谢综合征、不良饮食习惯、不健康生活方式及环境污染等^[2]。这些因素可能在一定程度上影响甲状腺组织的细胞生长调控,增加恶性病变的风险。随着现代超声成像技术的快速普及和公众健康意识的提升,临床上越来越多的甲状腺癌病例得以及时发现并诊断。对于早期患者,通过手术切除病灶通常可获得较为理想的预后,且大部分患者的长期生存率较高。然而,复发风险较高或发生远处转移的患者,通常需要手术、¹³¹碘治疗以及靶向治疗等综合措施,以控制病情并延长生存期^[3]。因此,深入研究PTC的分子机制以揭示其进展规律,尤其是其致癌过程中的关键调控通路,以期开发出创新的治疗策略,从而为高风险患者提供更有效的治疗选择,是当前甲状腺癌研究领域的迫切需求和重要挑战。环状RNA(circRNA)是一类存在于真核生物中的内源性非编码RNA,主要通过外显子反向剪接形成。其独特的共价闭环状结构和典型的剪接位点赋予circRNA相较于其他非编码RNA更高的稳定性^[4]。最初,circRNA被视为基因重排及剪接过程中产生的无功能副产物。然而,随着高通量测序技术和生物信息学的快速发展,研究发现circRNA在癌症的发生和发展中具有重要的生物学功能,其作用机制复杂多样。circRNA可通过充当miRNA海绵、结合RNA结合蛋白及部分circRNA编码短肽等方式发挥作用,此外还参与蛋白质翻译调控。在多种恶性肿瘤中,circRNA已被证明在肿瘤细胞增殖、侵袭和转移等关键生物学过程中发挥了重要作用,对癌症进展产生显著影响^[5]。hsa_circ_0073762由725个核苷酸构成,是通过SLC12A2 mRNA的反向剪接生成的circRNA。目前,尚无文献报道其具体功能。本研究旨在验证hsa_circ_0073762在PTC细胞中的

存在性,并探讨其在PTC进展中的作用及潜在分子机制。研究结果显示,hsa_circ_0073762在PTC细胞和组织中稳定存在,且其表达水平较正常甲状腺细胞系及癌旁组织显著上调。功能分析表明,hsa_circ_0073762可促进PTC细胞的增殖、迁移和侵袭。hsa_circ_0073762通过与miR-548c-3p竞争性结合并调控ENAH的表达,形成ceRNA调控网络,从而影响PTC的进展过程。本研究揭示了hsa_circ_0073762在PTC进展中所涉及的调控机制,为PTC诊治提供了新思路。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 组织样本均来自在2021年4月—2022年12月河北医科大学第一医院接受治疗的PTC患者,其中男性15例,女性10例,年龄29~69岁。纳入标准:术后石蜡病理确诊为PTC;术前甲状腺功能无异常。排除标准:既往其他恶性肿瘤及自身免疫系统疾病病史。所有实验均遵循《赫尔辛基宣言》的相关伦理准则。采集的组织样本被迅速冷冻后储存于-80℃的冷冻设备中,或置于RNAlater溶液中保存过夜,随后转移至-80℃的储存设备,以便进一步实验使用。

本研究经河北医科大学第一医院伦理委员会批准通过(批准号20210373),所有患者均签署了书面知情同意书。

1.2 细胞培养与转染 本研究使用的细胞系包括TPC-1、BCPAP和Nthy-ori 3-1。TPC-1和Nthy-ori 3-1细胞系源自本实验室细胞库,BCPAP细胞系购自HyCyte。所有细胞系均通过短串联重复分析进行身份鉴定,以确保细胞来源准确无误并避免交叉污染。TPC-1、BCPAP和Nthy-ori 3-1细胞均培养于含10%胎牛血清(FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.)的RPMI 1640培养基中,培养条件为37℃、5% CO₂。Nthy-ori 3-1细胞系作为非肿瘤对照,用于比较基因表达差异。miR-548c-3p模拟物(序列:5'-CAAAAUCUCAAUUACU-UUUGC-3')及其阴性对照(序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')购自上海

生工生物科技有限公司。小干扰 RNA (siRNA 序列: 5'-CUUCCAGGAGGAGCAUAUAUUTT-3') 及其阴性对照(序列: 5'-CAACCACCAGGGACAU-AUAGUTT-3') 购自苏州吉玛生物科技有限公司。hsa_circ_0073762 与 ENAH 及 miR-548c-3p 的结合位点通过 XhoI 和 NotI 酶切并插入 psiCHECK-2 质粒(上海生工生物科技有限公司)。TPC-1、BCPAP 和 Nthy-ori 3-1 细胞接种于 6 孔板,并在 37 °C 培养 24 h 至融合度达 70%~90%。随后,按制造商说明使用 Lipofectamine 3000 进行转染。

1.3 RNA 提取与逆转录-定量聚合酶链式反应 (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 从甲状腺细胞系和临

床样本中提取总 RNA 使用 FreeZol 试剂(R711, 南京生工生物科技有限公司)。反转录反应通过 PrimeScript™ RT 试剂盒(北京博尔)进行,采用随机引物逆转录 cDNA。hsa_Circ_0073762 的表达水平采用 RT-qPCR 测定,使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京生工),并以 GAPDH 作为内参基因用于标准化相对表达水平。PCR 循环程序为:95 °C 预变性 10 min,随后 95 °C 变性 10 s,60 °C 退火和延伸 1 min。相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。Hsa_circ_0073762、GAPDH 发散引物及收敛引物序列,SLC12A2 收敛引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

基因	引物类型	正向引物	反向引物
hsa_circ_0073762	发散引物	5'-G TTCCTATGGCCTAATGAACAAC T-3'	5'-A ACCACATACATAGCAACTGCAAC-3'
	收敛引物	5'-GGTCTAATCTTCGCCTTTGC-3'	5'-CTTTTGCTTCCCACTCCATT-3'
GAPDH	发散引物	5'-TTCGTCAAGAAGGTGGTG-3'	5'-CAGGGATGCCAGGGAC-3'
	收敛引物	5'-ATCAGCCTCAAGATCATCAGCAATG-3'	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACG-3'
SLC12A2	收敛引物	5'-GCAGGTATATTTTCAGCCACTCTT-3'	5'-AAGCTGGGTAGATGTTGTCCTTAC-3'

1.4 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)法 细胞活力使用 CCK-8(Abbkin)根据制造商说明书进行评估。每孔接种 3 000 个细胞于 96 孔板中,培养 24、48、96 h 后,加入 CCK-8 溶液并在 37 °C 下孵育 1 h。随后,使用 SpectraMax 酶标仪 (Molecular Devices)在 450 nm 波长下测量吸光度值,必要时使用 600~650 nm 波长作为背景参考。

1.5 划痕愈合实验 将 PTC 细胞 (2×10^5 细胞/mL)接种于六孔板中,并在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,直至细胞融合度达到约 90%。使用无菌移液管尖端划痕以去除单层细胞,形成划痕区域。用新鲜培养基轻柔冲洗孔内 2 次去除脱落细胞,随后继续在不含血清的培养基中培养,以抑制细胞增殖对迁移的影响。定时使用显微镜观察并拍摄切口边缘的细胞迁移情况。通过图像分析软件测量划痕区域的初始和后续面积,以定量评估细胞迁移程度。

1.6 琼脂糖凝胶电泳 取 10 μg RNA 并按 1 U/μg RNA 的比例加入 RNase R (P0301, Geneseeed),在 37 °C 下孵育 30 min 以降解线性 RNA。处理后的 RNA 使用随机引物进行反转录生成 cDNA,随后进行 PCR 扩增。cDNA 和 gDNA 的 PCR 产物在 TAE 缓冲液中,通过 2% 琼脂糖凝胶分离,并在凝胶中加入 EB 染料。在 100 V 电压下电泳 30 min 后,于紫外线下显影,观察扩增产物的分离结果。

1.7 克隆形成实验 每孔接种 1 000 个 PTC 细胞

于 6 孔板中,并在 37 °C、5% CO₂ 的恒定培养条件下培养 14 d,以促进细胞克隆的生长。培养期结束后,用预冷的甲醇将细胞固定 10~15 min,以保持细胞形态和克隆结构的完整性。随后,用 0.5% 结晶紫染色液对固定后的细胞进行染色,染色时间为 30 min,以确保细胞克隆清晰可见。染色完成后,轻柔漂洗去除过量染料,并在显微镜下观察。使用尼康 Eclipse E600 显微镜对染色后的克隆进行计数,计数标准为包含 50 个以上细胞的聚集体被定义为有效克隆,从而获得可靠的克隆形成数据。

1.8 Transwell 实验 细胞迁移和侵袭使用孔径为 8 μm 的 Transwell 小室 (Corning 公司)进行评估。将 2×10^4 个 PTC 细胞与 200 μL 无血清 RPMI 1640 培养基一同加入上室进行侵袭分析,下室加入 600 μL 完全 RPMI 1640 培养基。孵育 48 h 后,去除上室中残留的细胞,并固定下室中的细胞,使用 Diff-Quik Stain 染色。通过光学显微镜计数细胞数量。

1.9 双荧光素酶报告基因实验 hsa_circ_0073762 和 ENAH 基因序列由上海生工生物科技有限公司合成,并分别插入 psiCHECK-2 双荧光素酶载体中,构建得到 hsa_circ_0073762-psi 和 ENAH-psi 质粒。所有构建的质粒与 miRNA 模拟物共同转入 TPC-1 细胞中,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂按推荐比例进行转染。转染 24 h 后,根据制造商说

说明书,使用双荧光素酶报告基因实验试剂盒(美伦生物)测定相对荧光素酶活性。相对荧光素酶活性通过 Firefly 荧光素酶活性相对于 Renilla 荧光素酶活性的比值计算得出。

1.10 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件分析数据,应用 GraphpadPrism8.0 软件制图。计量资料比较采用 t 检验、单因素方差分析和 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa_circ_0073762 在 PTC 中高表达 对 PTC 细胞系 (TPC-1 和 BCPAP) 及正常甲状腺细胞系 (Nthy-ori 3-1) 进行了转录组测序。在甲状腺癌和正常细胞系之间共鉴定出 155 个差异表达的 circRNA,其中包括 115 个上调的 circRNA 和 40 个

下调的 circRNA (基于 fold change > 2 和 $P < 0.05$)。选取差异表达最显著的 5 个 circRNA,进行了 3 次技术重复的 RT-qPCR 验证,结果显示,TPC-1 细胞系 hsa_circ_0001445、hsa_circ_0037158、hsa_circ_0073762、hsa_circ_0005455 表达水平大于 Nthy-ori 3-1 细胞系,hsa_circ_0002111 表达水平小于 Nthy-ori 3-1 细胞系,BCPAP 细胞系 hsa_circ_0073762、hsa_circ_0005455 表达水平大于 Nthy-ori 3-1 细胞系,hsa_circ_0002111 表达水平小于 Nthy-ori 3-1 细胞系,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),hsa_circ_0073762 是其中差异表达最显著的 circRNA,见表 2。随后通过 RT-qPCR 检测了 15 例 PTC 及其相应的邻近非癌组织中 hsa_circ_0073762 的表达水平,结果显示癌组织中 hsa_circ_0073762 的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 circRNA 在甲状腺正常细胞系及 PTC 细胞系表达水平

Table 2 Expression levels of circRNA in thyroid normal cell lines and papillary thyroid carcinoma cell lines

($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	hsa_circ_0001445	hsa_circ_0037158	hsa_circ_0073762	hsa_circ_0005455	hsa_circ_0002111
Nthy-ori 3-1	1.00±0.23	1.00±0.13	1.00±0.24	1.00±0.03	1.00±0.05
TPC-1	4.24±1.09*	5.54±0.28*	13.60±1.01*	1.60±0.08*	0.61±0.07*
BCPAP	1.17±0.40	1.43±0.12	3.98±0.80*	1.60±0.26*	4.08±0.20*
F 值	14.260	348.400	152.300	10.000	456.600
P 值	0.005	<0.001	<0.001	0.012	<0.001

* P 值 < 0.05 与 Nthy-ori 3-1 比较 (SNK- q 检验)

表 3 hsa_circ_0073762 在 PTC 及癌旁组织表达水平

Table 3 Expression levels of hsa_circ_0073762 in PTC and adjacent non-tumor tissues

($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	hsa_circ_0073762 水平
癌旁组织	1.00±0.62
癌组织	1.83±1.76
t 值	2.310
P 值	0.036

2.2 hsa_circ_0073762 环性验证 hsa_circ_0073762 位于 5 号染色体的 SLC12A2 基因的第 5~10 外显子之间,完整长度为 725 个核苷酸。为验证其环状结构,通过对 RT-qPCR 产物克隆入 T 载体并进行 Sanger 测序,确认了 hsa_circ_0073762 的反向剪接位点 (图 1)。为了进一步验证其环状特性,样品进行了 RNase R 处理。由于 RNase R 选择性降解线性 RNA 而对环状 RNA 影响较小,结果显示,GAPDH 和 SLC12A2 的相对表达水平显著降低,而 hsa_circ_0073762 的表达基本保持不变 ($P < 0.01$),见表 4。利用 GAPDH 和 hsa_circ_0073762 的发散和收敛引物对基因组 DNA (gDNA) 和互补 DNA (cDNA) 进行扩增,并对扩增产物进行核酸电

泳分析。结果显示,在 cDNA 中,hsa_circ_0073762 的收敛引物扩增未出现条带,而 GAPDH 的发散引物也未出现条带,见图 2。实验结果进一步支持 hsa_circ_0073762 具有稳定的环状结构。

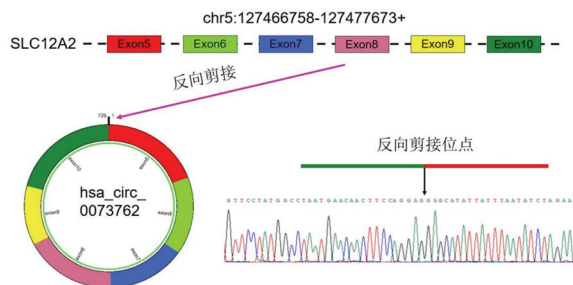


图 1 Sanger 测序确认剪接位点

Figure 1 Sanger sequencing confirmation of splicing sites

表 4 RNase R 处理后表达量变化

Table 4 Expression level changes after RNase R treatment

($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	hsa_circ_0073762	SLC12A2	GAPDH
RNase R-	1.00±0.54	1.00±0.01	1.00±0.01
RNase R+	0.79±0.39	0.03±0.01	0.25±0.17
t 值	0.460	78.230	6.340
P 值	0.672	<0.001	0.003

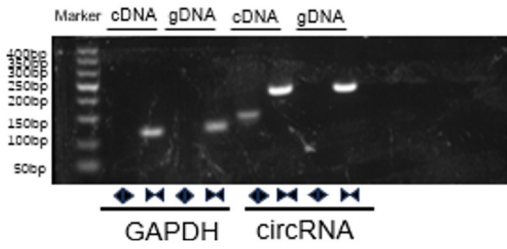


图2 核酸电泳实验

Figure 2 Nucleic acid electrophoresis experiment

2.3 敲低 hsa_circ_0073762 抑制了 PTC 细胞的增殖、迁移和克隆形成能力 为了研究 hsa_circ_0073762

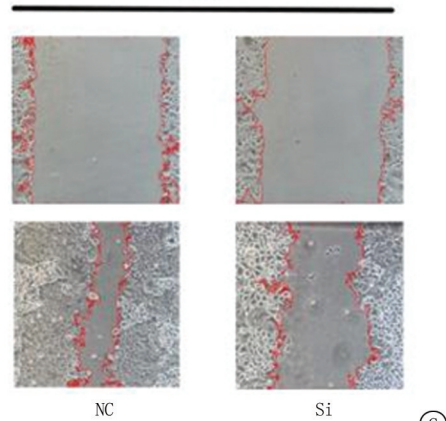
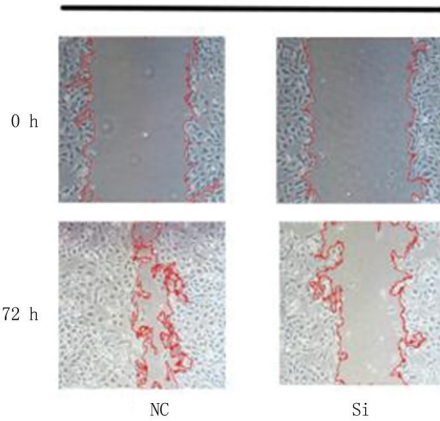
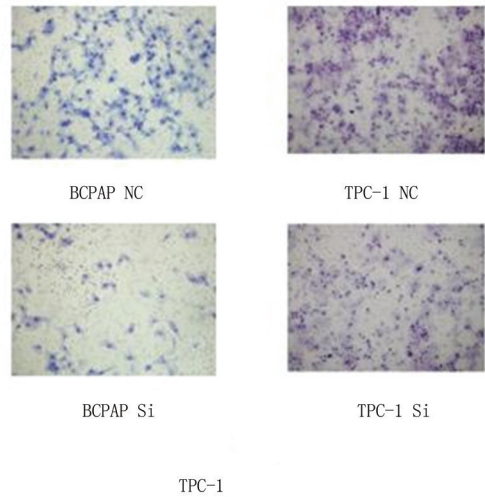
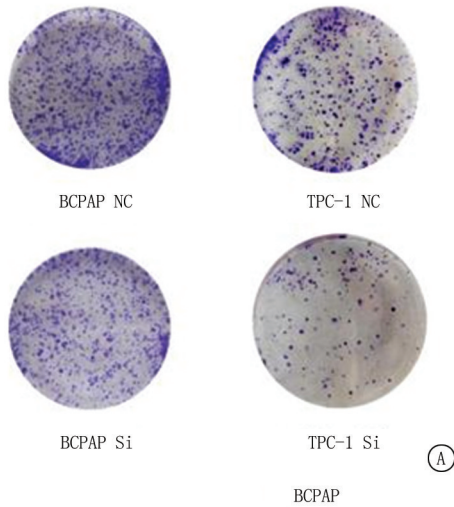


图3 敲低 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞系生物行为的影响

A. 平板克隆实验结果; B. 迁移实验结果(Diff-Quik Stain 染色 ×100); C. 细胞划痕实验结果(×100)

Figure 3 Effect of hsa_circ_0073762 knockdown on biological behavior of PTC cell line

表5 敲低 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞系克隆形成能力的影响

Table 5 Effect of hsa_circ_0073762 knockdown on clone formation ability of PTC cell line

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	BCPAP 单克隆形成数目	TPC-1 单克隆形成数目
对照组	218.33±10.34	163.33±11.84
敲低组	147.00±9.80	88.00±26.50
t 值	14.260	3.670
P 值	0.005	0.021

表6 敲低 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞系侵袭能力的影响(Transwell)

Table 6 Effect of hsa_circ_0073762 knockdown on invasive ability of PTC cell line (Transwell assay)

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	BCPAP 迁移细胞数目	TPC-1 迁移细胞数目
对照组	148.0±18.67	381.67±40.80
敲低组	57.33±8.34	172.67±18.35
t 值	6.270	6.610
P 值	0.003	0.003

0073762 对 PTC 进展的影响, 将敲低的 hsa_circ_0073762 转染入 PTC 细胞系 TPC-1 和 BCPAP 中, 进行细胞功能实验。平板克隆实验结果表明, 敲低 hsa_circ_0073762 显著降低了 PTC 细胞的克隆形成能力($P < 0.05$), 见图 3, 表 5。迁移实验表明, 敲低后显著降低了 PTC 细胞的侵袭及迁移能力($P < 0.05$), 见图 3, 表 6。划痕实验表明, 敲低后显著降低了 PTC 细胞的划痕愈合能力($P < 0.05$), 见图 3, 表 7。Cck-8 增殖实验表明, 敲低后显著降低了 PTC 细胞的划痕愈合能力($P < 0.05$), 见图 4。

表7 敲低 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞系划痕愈合的影响

Table 7 Effect of hsa_circ_0073762 knockdown on scratch wound healing in PTC cell line

(n=3, $\bar{x} \pm s, \%$)

组别	BCPAP 细胞划痕愈合率	TPC-1 细胞划痕愈合率
对照组	63.33±8.38	70.00±6.53
敲低组	25.00±6.98	39.67±1.25
t 值	4.970	6.450
P 值	0.008	0.003

2.4 hsa_circ_0073762、miR-548c-3p 与 ENAH 构成 ceRNA 网络 通过 circbank 和 circinteractome 数据库预测了 hsa_circ_0073762 的下游 miRNA 靶点,利用维恩图分析筛选出 miR-548c-3p 作为研究对象,见图 5。基于多数据库交集和高表达筛选标准,通过 miRWalk、miRtarbase、miRDB 和

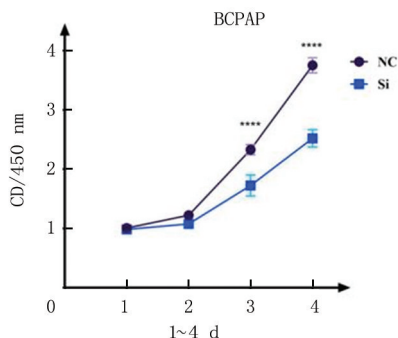


图4 CCK-8 细胞增殖实验

Figure 4 CCK-8 cell proliferation assay

hsa_circ_0073762(5' ... 3')	UGCAAUUUAACUUGAUUUUUUC
hsa-miR-548c-3p(3' ... 5')	CGUUUUCAUUAACU-CUAAAAAC
ENAH(5' ... 3')	AAGUUUGGAGGGAUUUUUUU

图5 hsa_circ_0073762、miR-548c-3p 与 ENAH 结合位点预测

Figure 5 Prediction of binding sites between hsa_circ_0073762, miR-548c-3p, and ENAH

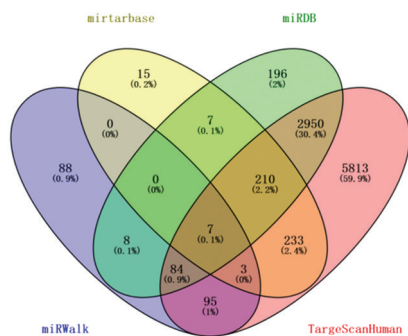
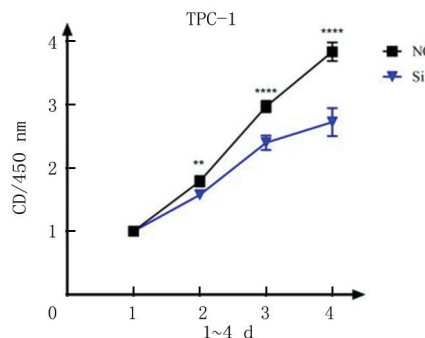


图6 Venn 图筛选 miR-548c-3p 下游靶基因

Figure 6 Venn diagram for screening downstream target genes

TargetScanHuman 数据库预测了 hsa-miR-548c-3p 的下游靶基因。进一步的维恩(Venn)图分析显示多个潜在靶基因,包括 ENAH、ST6GALNAC3、SMU1、CDC27、ATP13A3、SMAD4 和 HNRNPU,见图 6。文献回顾表明,ENAH 在肿瘤进展中具有潜在促进作用。TCGA 数据库分析进一步验证了 ENAH 在 PTC 中的高表达,见图 7。因此将其作为后续研究的重点靶基因。双荧光素酶报告基因实验结果显示,在共转染 Psicheck 2.0/hsa_circ_0073762-miRNA 过表达(OE)和 Psicheck 2.0/ENAH-miRNA OE 组时,荧光强度显著下降($P < 0.05$),而在其他对照组中未观察到显著变化,见表 8。综上所述,环状 RNA hsa_circ_0073762 可能通过充当 miR-548c-3p 的 ceRNA,从而上调 ENAH 的表达并促进 PTC 的进展。



of miR-548c-3p

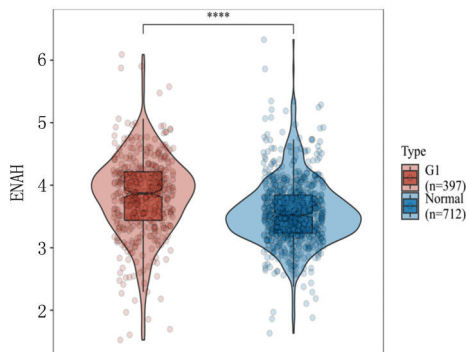


图7 TCGA 数据库分析 ENAH 在 PTC 中表达情况

Figure 7 TCGA database analysis of ENAH expression in PTC

表8 荧光素酶活性

Table 8 Luciferase activity

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	Psicheck 2.0/hsa_circ_0073762	Psicheck 2.0/ENAH	Psicheck 2.0
	miRNA 对照组	5.64±0.42	
miRNA 过表达组	3.05±0.18	2.52±0.33	2.18±0.14
t 值	9.800	2.790	0.710
P 值	<0.001	0.049	0.518

3 讨 论

甲状腺癌是最常见的内分泌恶性肿瘤,也是我国增长速度最快的癌症之一^[6],优化治疗策略对于提高患者生存率、降低复发风险具有重要意义^[7]。然而,甲状腺癌的分子调控机制复杂且尚未完全阐明,缺乏精准的分子机制及生物标志物仍是甲状腺癌诊疗的主要挑战。本研究首次验证了 hsa_circ_0073762 的环状结构,并揭示其通过调控 miR-548c-3p/ENAH 通路在 PTC 细胞增殖、迁移和侵袭中的重要作用。此发现不仅填补了 hsa_circ_0073762 研究的空白,还为甲状腺癌的分子机制研究提供了较新的视角。

随着 RNA 测序技术的迅猛发展,将测序技术与生物信息学相结合已成为现阶段肿瘤诊疗的热点方向。经对测序数据对比,已在各种疾病中发现了大量差异表达的 circRNA^[8]。与传统线性 mRNA 相比,得益于其环形结构,circRNA 对外切酶的抵抗能力更强,具有更高的稳定性和特异性,因此它们作为判断患者预后的生物标志物更具有优势^[9]。研究发现,circRNA 是参与调控肿瘤发生发展、化疗抗性、远处转移的重要调控因子^[10]。例如在骨肉瘤中 hsa_circ_0020378 上调,体内和体外实验表明,hsa_circ_0020378 通过调节 miR-339-3p/COL1A1 轴促进骨肉瘤的发生和发展^[11]。circ-CCT2 稳定 PTBP1 mRNA 并通过募集和上调 TAF15 蛋白来激活 Wnt/b-catenin 信号传导,从而促进肝母细胞瘤进展^[12]。乳腺癌中的紫杉醇耐药性与 circAMOTL1 之间存在高度相关性,circAMOTL1 参与 AKT 通路的调节并促进抗凋亡蛋白的表达,导致乳腺癌患者对紫杉醇耐药^[13]。circPPAP2B 在肾癌中高表达,并作为 miRNA 海绵与 miR-182-5p 相结合,通过增加肾透明细胞癌中细胞色素 P450 家族 1 亚家族 B 成员 1 的表达,促进了细胞的增殖和转移能力^[14]。同样,circRNA 在 PTC 的进展中也发挥了重要作用。hsa_circ_0058124 与 PTC 患者的恶性特征和不良预后有关,并可促进 PTC 细胞增殖、致瘤性、肿瘤侵袭和转移,作为竞争性内源性 RNA 调节 miRNA-218-5p 及其靶基因 NUMB 表达,在体外和体内抑制 NOTCH3/GATAD2A 信号转导轴^[15]。hsa_circ_0011058 高表达预示 PTC 患者的总生存期较差,敲低 hsa_circ_0011058 通过释放 miR-335-5p 下调 YAP1,抑制小鼠的 PTC 细胞增殖、血管生成和放射抗性以及肿瘤生长^[16]。

本研究通过高通量测序技术,将正常甲状腺细胞与 PTC 细胞送测,对比后发现差异表达的 circRNA,根据测序结果,选择差异较大 circRNA 再行 RT-qPCR 验证,通过文献检索、引物设计及差异倍数筛选,最终确立了 hsa_circ_0073762 作为研究对象,并在 PTC 患者癌及癌旁组织中进行验证 hsa_circ_0073762 表达差异。RT-qPCR 结果表明,hsa_circ_0073762 在 PTC 组织中表达明显高于癌旁组织,其结果与 circRNA 测序数据分析一致。考虑到 circRNA 的环形结构是其发挥独特功能的结构基础,将其 Divergent 引物 RT-qPCR 产物送 sanger 测序以核对其反向剪接位点碱基序列,测序结果与预期一致。同时,采用 Divergent 引物、Convergent 引物行 PCR 后进行核酸电泳,验证其环性结构。采用 Rnase 消化实验验证了 hsa_circ_0073762 的稳定性。为研究 hsa_circ_0073762 对 PTC 发生发展的影响,本研究通过敲低 hsa_circ_0073762,利用 CCK8 及划痕实验检测 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞增殖能力的影响,利用 Transwell 细胞侵袭实验检测 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞侵袭及迁移能力的影响,利用平板克隆实验检测 hsa_circ_0073762 对 PTC 细胞集落形成能力的影响。研究表明,敲低 hsa_circ_0073762 可抑制 PTC 细胞的增殖、迁移及集落形成能力。

circRNA 发挥生物学功能方式有许多,例如 RNA-蛋白质相互作用、调节亲本基因的表达情况和进行翻译等,但最早研究,最常见的生物学功能方式为作为 miRNA“分子海绵”。miRNA 是一类短小的非编码 RNA,通常通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 结合,在转录后水平调控基因表达,主要通过抑制 mRNA 的翻译或促进其降解。circRNA 具有与 miRNA 结合的能力,与 mRNA 形成竞争性结合关系,从而影响 miRNA 对靶基因的调控作用。如 hsa_circ_0003928 可作为 miR-136-5p 的海绵,上调 PAQR3 的表达,进而调控高糖诱导的人肾皮质近曲小管细胞的增殖、氧化应激、纤维化和凋亡^[17]。hsa_circ_0002111 可作为 miRNA 分子海绵直接与 miR-134-5p 结合,并增加 FSTL1 的表达,进而促进 PTC 细胞的恶性行为^[18]。

为研究 hsa_circ_0073762 发挥作用的具体机制,通过 circbank 和 circinteractome 数据库预测了 hsa_circ_0073762 的下游 miRNA 靶点,根据结合 context+ score percentile 得分情况及文献回顾选取 miR-548c-3p 作为研究对象。研究显示,miR-

548c-3p 在多种癌症中起到了抑癌作用。miR-548c-3p在 PTC 组织和细胞系中下调,miR-548c-3p 通过抑制 HIF1 α 介导的 VEGF 信号通路抑制肿瘤进展^[19]。在胃癌中,miR-548c-3p 可与细胞内氯离子通道蛋白 1 结合,影响 CD8⁺ T 细胞的功能并延缓其凋亡^[20]。在骨肉瘤中,SMAD2 是 miR-548c-3p 的靶标,miR-548c-3p 可下调 SMAD2 的表达,进而抑制细胞的增殖和转移能力^[21]。随后使用 miRWalk、miRtarbase、miRDB 和 TargetScanHuman 数据库预测 miR-548c-3p 的下游靶基因,通过 Venn 方法得到潜在靶基因,结合文献回顾及 TCGA 数据库分析选取 ENAH 作用潜在靶基因进行研究。ENAH 是 Ena/VASP 家族的成员,该家族还包括 VASP(血管扩张剂刺激的磷蛋白)和 Ena/VASP 等。Ena/VASP 家族在调节细胞运动、形态学和黏附以及侵袭和转移过程中所需的过程中起重要作用^[22]。许多报告表明,ENAH 在结直肠癌、宫颈癌、胰腺癌和乳腺癌的恶性反式形成过程中上调^[22-25]。Di Modugno 等^[26]发现,在乳腺癌中,ENAH 过表达与肿瘤大小、高度侵袭特性和晚期临床分期相关。Hu 等^[27]证实,ENAH 在肝细胞癌中上调,与肿瘤分化和分期相关,最重要的是,其过表达与较差的预后有关,ENAH 可能是肝细胞癌的潜在预后生物标志物。本研究通过双荧光素酶实验,验证了 hsa_circ_0073762、ENAH 与 miR-548c-3p 的结合情况,实验结果表明,hsa_circ_0073762、ENAH 与 miR-548c-3p 存在结合,hsa_circ_0073762 可能通过吸附 miR-548c-3p 进而促进 ENAH 的表达情况。

本研究虽然证明了 hsa_circ_0073762 在 PTC 细胞及甲状腺正常细胞中稳定存在且差异表达,hsa_circ_0073762/miR-548c-3p/ENAH 可能是调控 PTC 的一条通路,参与甲状腺乳头癌的发生发展,但所做的工作还待补充,还需要通过更为全面和细致的体外及体内分子实验,结合大量患者的临床数据,进一步验证 hsa_circ_0073762/miR-548c-3p/ENAH 这一信号通路在 PTC 中的作用,旨在深入探讨 hsa_circ_0073762 的临床应用潜力。

[参考文献]

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

- [2] Mao J, Zhang Q, Zhang H, et al. Risk factors for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: a systematic review and Meta-analysis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 265.
- [3] Araque KA, Gubbi S, Klubo-Gwiedzinska J. Updates on the management of thyroid cancer[J]. Horm Metab Res, 2020, 52(8): 562-577.
- [4] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. Mol Cell, 2018, 71(3): 428-442.
- [5] Li Q, Ren X, Wang Y, et al. CircRNA: a rising star in leukemia[J]. Peer J, 2023, 11: e15577.
- [6] Wu J, Zhao X, Sun J, et al. The epidemic of thyroid cancer in China: current trends and future prediction[J]. Front Oncol, 2022, 12: 932729.
- [7] Chen DW, Lang BHH, McLeod DSA, et al. Thyroid cancer[J]. Lancet, 2023, 401(10387): 1531-1544.
- [8] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 675-691.
- [9] Arnaiz E, Sole C, Manterola L, et al. CircRNAs and cancer: Biomarkers and master regulators[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 90-99.
- [10] Liu Q, Pan LZ, Hu M, et al. Molecular network-based identification of circular RNA-associated ceRNA network in papillary thyroid cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(2): 1293-1299.
- [11] Liu L, Huang W. hsa_circ_0020378 regulating miR-339-3p/COL1A1 promotes osteosarcoma progression[J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2274120.
- [12] Zhu Q, Hu Y, Jiang W, et al. Circ-CCT2 activates Wnt/ β -catenin signaling to facilitate hepatoblastoma development by stabilizing PTBP1 mRNA [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2024, 17(2): 175-197.
- [13] Yang W, Gong P, Yang Y, et al. Circ-ABC10 contributes to paclitaxel resistance in breast cancer through let-7a-5p/DUSP7 axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 2327-2337.
- [14] Miao Z, Li J, Wang Y, et al. Hsa_circ_0136666 stimulates gastric cancer progression and tumor immune escape by regulating the miR-375/PRKDC Axis and PD-L1 phosphorylation[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 205.
- [15] Yao Y, Chen X, Yang H, et al. Hsa_circ_0058124 promotes papillary thyroid cancer tumorigenesis and invasiveness through the NOTCH3/GATAD2A axis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 56.
- [16] Zhang Z, Wang W, Su Z, et al. Circ_0011058 facilitates proliferation, angiogenesis and radioresistance in papillary thyroid cancer cells by positively regulating YAP1 via acting as miR-335-5p sponge[J]. Cell Signal, 2021, 88: 110155.
- [17] Zhang W, Zhang L, Dong Q, et al. Hsa_circ_0003928 regulates the progression of diabetic nephropathy through miR-136-5p/PAQR3 axis[J]. J Endocrinol Invest, 2023, 46

- (10):2103-2114.
- [18] Zhang H, Jiang J, He X, et al. Circ_0002111/miR-134-5p/FSTL1 signal axis regulates tumor progression and glycolytic metabolism in papillary thyroid carcinoma cells [J]. *J Endocrinol Invest*, 2023, 46(4):713-725.
- [19] Du Y, Zhu J, Chu BF, et al. MiR-548c-3p suppressed the progression of papillary thyroid carcinoma via inhibition of the HIF1 α -mediated VEGF signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15):6570-6578.
- [20] Li B, Liang L, Chen Y, et al. Circ_0008287 promotes immune escape of gastric cancer cells through impairing microRNA-548c-3p-dependent inhibition of CLIC1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111:108918.
- [21] Zheng S, Wan L, Ge D, et al. LINC00266-1/miR-548c-3p/SMAD2 feedback loop stimulates the development of osteosarcoma[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):576.
- [22] Krause M, Dent EW, Bear JE, et al. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19:541.
- [23] Gurzu S, Jung I, Prantner I, et al. The expression of cytoskeleton regulatory protein Mena in colorectal lesions[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2008, 49(3):345-349.
- [24] Di Modugno F, Mottolise M, Di Benedetto A, et al. The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:1470.
- [25] Pino MS, Balsamo M, Di Modugno F, et al. Human Mena+11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:4943.
- [26] Di Modugno F, DeMonte L, Balsamo M, et al. Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena+11a; epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena+11a phosphorylation in breast cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2007, 67:2657.
- [27] Hu K, Wang J, Yao Z, et al. Expression of cytoskeleton regulatory protein Mena in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance[J]. *Med Oncol*, 2014, 31:939.

(本文编辑:赵丽洁)