

circ_100284 通过 miR-217/MAPK1 调控食管鳞状细胞癌侵袭及其对 5-FU 化疗敏感性的影响

史艳伟¹, 米彩锋^{1*}, 牛丽林¹, 杨洋²

¹平顶山学院第一附属医院/平顶山市第一人民医院消化内科, 河南平顶山 467000; ²郑州大学第一附属医院胸外科, 河南郑州 450052

[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0787.2024.0201

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 史艳伟, 米彩锋, 牛丽林, 等. circ_100284 通过 miR-217/MAPK1 调控食管鳞状细胞癌侵袭及其对 5-FU 化疗敏感性的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(10): 1184-1195.

[收稿日期] 2023-06-06 [录用日期] 2023-08-15 [上线日期] 2024-02-01

[摘要] **目的** 探究环状 RNA(circ_100284)作为竞争性内源 RNA(ceRNA)通过调控 miR-217/丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)影响食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞侵袭及其对 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗的敏感性。**方法** 生物信息学分析 ESCC 中差异表达的 circRNAs。qRT-PCR 检测 ESCC 组织和细胞中 circ_100284 的表达。使用浓度逐渐增加的 5-FU 处理 ESCC 细胞 KYSE450 以建立 5-FU 耐药 KYSE450 细胞系(KYSE450-R), MTT 实验检测 KYSE450 和 KYSE450-R 细胞的 IC₅₀。qRT-PCR 检测 KYSE450 和 KYSE450-R 细胞中 circ_100284、miR-217 和 MAPK1 mRNA 的表达, Western blotting 检测 MAPK1 蛋白的表达。取 KYSE450-R 细胞, 设置: (1)空白对照组(不做处理)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-circ_100284 组(转染 si-circ_100284)、pc-Control 组(转染 pc-Control)、pc-circ_100284 组(转染 pc-circ_100284)、pc-circ_100284+mimic NC 组(转染 pc-circ_100284 和 mimic NC)与 pc-circ_100284+miR-217 mimic 组(转染 pc-circ_100284 和 miR-217 mimic), 采用 MTT 实验检测细胞活力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。(2)空白对照组(不做处理)、si-NC 组(转染 si-MAPK1 的阴性对照)、si-MAPK1 组(转染 si-MAPK1)、si-MAPK1+inhibitor NC 组(转染 si-MAPK1 和 inhibitor NC)与 si-MAPK1+miR-217 inhibitor 组(转染 si-MAPK1 和 miR-217 inhibitor), 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 MAPK1 mRNA 和蛋白的表达, MTT 实验检测细胞活力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。将 circ_100284-WT 或 circ_100284-MUT 报告质粒、MAPK1-WT 或 MAPK1-MUT 报告质粒分别与 miR-NC 或 miR-217 mimic 共转染 KYSE450-R 细胞 48 h, 采用双荧光素酶报告实验测定荧光素酶相对活性。**结果** 生物信息学分析显示 circ_100284 在 ESCC 中呈高表达。与癌旁正常组织比较, ESCC 组织中 circ_100284 表达明显增加($P<0.05$); 与健康人食管上皮细胞 HEEC 比较, ESCC 细胞系 TE-11、ECA09 和 KYSE450 中 circ_100284 表达明显增加($P<0.05$)。与 KYSE450 细胞比较, KYSE450-R 细胞的 IC₅₀ 增加, circ_100284、MAPK1 表达增加但 miR-217 表达被抑制($P<0.05$)。与 si-NC 组比较, si-circ_100284 组细胞活力被抑制, 细胞侵袭数减少, 细胞凋亡率增高($P<0.05$)。与 pc-Control 组比较, pc-circ_100284 组细胞活力和细胞侵袭数增加, 细胞凋亡率降低($P<0.05$), 而 pc-circ_100284 对 ESCC 细胞恶性生物学行为的影响被 miR-217 过表达逆转($P<0.05$)。与 si-NC 组比较, si-MAPK1 组细胞活力被抑制, 细胞侵袭数减少, 细胞凋亡率增高($P<0.05$), 而 si-MAPK1 对 ESCC 细胞生物学行为的影响被 miR-217 inhibitor 逆转($P<0.05$)。circ_100284 与 miR-217、miR-217 与 MAPK1 具有靶向关系。**结论** circ_100284 通过调控 miR-217/MAPK1 进而增强 ESCC 细胞的侵袭能力, 抑制 ESCC 细胞对 5-FU 化疗的敏感性, 在 ESCC 中发挥促癌因子的作用。

[关键词] circ_100284; miR-217; 丝裂原活化蛋白激酶 1; 食管癌; 化疗敏感性

circ_100284 via miR-217/MAPK1 regulates esophageal squamous cell carcinoma invasion and its effects on 5-FU chemotherapy sensitivity

Shi Yan-Wei¹, Mi Cai-Feng^{1*}, Niu Li-Lin¹, Yang Yang²

¹Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Pingdingshan University/Pingdingshan First People's Hospital,

[基金项目] 吴阶平医学基金(24210006)

[作者简介] 史艳伟, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤方面的研究

[通信作者] 米彩锋, E-mail: 18639730821@wo.cn

Pingdingshan, Henan 467000, China

²Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

*Corresponding author, E-mail: 18639730821@wo.cn

This work was supported by the Wu Jieping Fund (24210006)

[Abstract] Objective To explore the effects of circ_100284 in affecting the invasion of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells and their sensitivity to 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy *via* regulating miR-217/mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) acting as a competing endogenous RNA (ceRNA). **Methods** The bioinformatics approach was used to analyze the differentially expressed circRNAs in ESCC. qRT-PCR was used to detect the expression of circ_100284 in ESCC tissues and cells. The 5-FU-resistant KYSE450 cell line (KYSE45-R) was established by increasing concentrations of 5-FU. The IC_{50} of 5-FU in KYSE450 and KYSE450-R cells was determined through MTT assay. qRT-PCR was used to detect the expression of circ_100284, miR-217, and *MAPK1* mRNA in KYSE450 and KYSE450-R cells, while Western blotting detecting the protein expression of MAPK1. In the experiments with KYSE450-R cells, we set up the following groups: (1) blank group (without treatment), si-NC group (transfected with si-NC), si-circ_100284 group (transfected with si-circ_100284), pc-Control group (transfected with pc-Control), pc-circ_100284 group (transfected with pc-circ_100284), pc-circ_100284+mimic NC group (transfected with pc-circ_100284 and mimic NC), and pc-circ_100284+miR-217 mimic group (transfected with pc-circ_100284 and miR-217 mimic). These groups were subjected to MTT assay to detect cell viability, Transwell assay to detect cell invasion, and flow cytometry to detect cell apoptosis. (2) Blank group (without treatment), si-NC group (transfected with si-MAPK1 negative control), si-MAPK1 group (transfected with si-MAPK1), si-MAPK1+inhibitor NC group (transfected with si-MAPK1 and inhibitor NC), and si-MAPK1+miR-217 inhibitor group (transfected with si-MAPK1 and miR-217 inhibitor). We detected the mRNA and protein expression of *MAPK1* using qRT-PCR and Western blotting. We evaluated cell viability using MTT assay, invasion with Transwell assay, and apoptosis by flow cytometry. circ_100284-WT or circ_100284-MUT reporter plasmids, as well as *MAPK1*-WT or *MAPK1*-MUT reporter plasmids, were co-transfected with miR-NC or miR-217 mimic into KYSE450-R cells for 48 h, and dual luciferase reporter assay was used to measure luciferase activity. **Results** The bioinformatics analysis revealed significant upregulation of circ_100284 in ESCC. Compared with adjacent normal tissues, the expression of circ_100284 in ESCC tissues is enhanced ($P<0.05$); compared with the HECC cells, the TE-11, ECA109 and KYSE450 ESCC cell lines showed enhanced expression of circ_100284 ($P<0.05$). Compared with the KYSE450 cells, KYSE450-R cells demonstrated increased IC_{50} with enhanced expression of circ_100284 and *MAPK1* but suppressed expression of miR-217 ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the si-circ_100284 group demonstrated inhibited invasion and proliferation of cells with increased apoptosis ($P<0.05$). Compared with pc-Control group, the invasion and proliferation of cells in the pc-circ_100284 group are increased, and cell apoptosis is decreased ($P<0.05$). Over-expression of miR-217 reversed the malignant biological behavior of ESCC cells induced by pc-circ_100284 ($P<0.05$). Compared with si-NC group, in the si-MAPK1 group, we observed decreased cell invasion and proliferation, and increased apoptosis ($P<0.05$), but miR-217 inhibitor reversed the effect of si-MAPK1 on the biological behavior of ESCC cells ($P<0.05$). The targeting relationship of circ_100284 and miR-217, miR-217 and *MAPK1* is confirmed. **Conclusion** circ_100284 promotes ESCC cell invasion by regulating miR-217/*MAPK1*, inhibits the chemosensitivity of ESCC cells to 5-FU, and acts as a tumor-promoting factor in ESCC.

[Key words] circ_100284; miR-217; mitogen-activated protein kinase 1; esophageal cancer; chemosensitivity

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤^[1-3]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌中最为常见的一种类型^[4],临床上常采用化疗药物治疗;然而,耐药性是ESCC治疗中的主要挑战,常导致化疗失败^[5]。因此迫切需要探究耐药的分子机制,寻找有效的解决方案。研究发现,非编码RNA在肿瘤发生发展中起着重要作用,形成复杂的调控网络^[6]。近年来,环状RNA(circRNA)作为一类特殊的非编码RNA被广泛研究^[7-9],与线性RNA不同, circRNA共价闭合的环形结构使其更稳定,不易被RNA外切酶降解,并且可通过多种机制参与调节转录、转运RNA、结合和翻译蛋白等过程^[10-11]。研究显示,在亚硫酸盐诱导正常膀胱细胞

恶性转化的过程中,随着亚硫酸盐作用时间的延长, circ_100284在膀胱癌细胞中的表达持续升高,且能够作为竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)吸附miR-217促进膀胱癌细胞增殖^[12];也有研究显示, circ_100284能够吸附miR-217进而促进肝癌细胞的恶性生物学行为^[13]。此外,在人角质形成细胞癌变进展中, circ_100284可竞争性结合miR-217而调控Zeste同源物增强子2(EZH2),增强细胞的集落形成、侵袭能力,从而促进癌变进展^[14]。因此, circ_100284作为促癌基因在膀胱癌、肝癌、人角质形成细胞癌变进展中发挥作用。研究显示, miR-217可作为抑癌因子参与调控ESCC的进展,且能抑制细胞增殖和侵袭,从而有效抑制ESCC的发展^[15-16]。

另有研究发现, miR-217与结直肠癌的5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)化疗敏感性密切相关^[17]。本课题组前期通过生物信息学工具对 circ_100284/miR-217 潜在的下游 mRNA 进行预测, 发现丝裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)与 miR-217 存在结合位点, 而 MAPK1 在 ESCC 中的作用及其机制已经初步阐明^[18]。因此, 本研究探究 circ_100284 通过 miR-217/MAPK1 对 ESCC 细胞生物学功能的作用机制及其对 5-FU 化疗敏感性的影响, 以期 ESCC 的治疗提供解决方案。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒、LipofectamineTM 3000 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; Trizol 试剂、Matrigel 基底胶、MTT 溶液、结晶紫、化学发光剂购自北京索莱宝科技有限公司; 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 探针试剂盒购自上海吉玛基因; DAPI 染液购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司; 一抗 MAPK1、山羊抗兔 IgG 二抗购自英国 Abcam 公司; 蛋白提取试剂盒购自北京碧云天生物技术有限公司; 双荧光素酶报告基因测试盒购自上海北诺生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从 NCBI 数据库查阅并获取 ESCC 相关 GEO 芯片表达数据, 选择芯片 GSE131969。该芯片数据中包含 3 例 ESCC 组织及其对应的癌旁正常组织。使用 R 语言 limma 包对癌旁正常组织和 ESCC 组织中差异 circRNAs 进行分析, 差异筛选条件为校正后 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 。在 MiRDB (<http://mirdb.org/index.html>) 和 RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>) 网站获取 miRNAs 的下游靶基因。采用在线生物信息学工具 DAVID6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 进行京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析。选择校正后 $P < 0.05$ 的通路进行后续分析。借助 Venn 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制交集。在 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 获取 ESCC 的疾病风险基因。String 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析蛋白相互作用关系。

1.2.2 组织标本收集 收集 2020 年 1 月—2021 年 12 月平顶山市第一人民医院收治的 37 例 ESCC 患者的肿瘤组织样本, 同期收集癌旁正常组织 (远端癌旁正常食管黏膜) 作为正常对照。所有患者在标本采集前均未进行放化疗治疗, 组织的获取和分离由专门的外

科医师进行, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。标本采集和使用均已获得受试者的知情同意。本研究获平顶山市第一人民医院伦理审查委员会审批 (20200007)。

1.2.3 细胞培养与分组 人食管鳞癌细胞系 (TE-11、ECA109、KYSE450) 及健康人食管上皮细胞系 (HEEC) 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供, 于含 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下常规培养。将筛选出的细胞株用不同浓度 (1、2、5、15、20、30 $\mu\text{g/ml}$) 的 5-FU 处理, 以建立 5-FU 耐药 KYSE450 细胞系 (KYSE450-R)。

取 KYSE450-R 细胞, 设置: (1) 空白对照组 (细胞不做处理)、si-NC 组 (细胞转染 si-NC)、si-circ_100284 组 (细胞转染 si-circ_100284)、pc-Control 组 (细胞转染 pc-Control)、pc-circ_100284 组 (细胞转染 pc-circ_100284)、pc-circ_100284+mimic NC 组 (细胞转染 pc-circ_100284 和 mimic NC)、pc-circ_100284+miR-217 mimic 组 (细胞转染 pc-circ_100284 和 miR-217 mimic), 采用 MTT 实验检测细胞活力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。(2) 空白对照组 (细胞不做处理)、si-NC 组 (细胞转染 si-MAPK1 的阴性对照)、si-MAPK1 组 (细胞转染 si-MAPK1)、si-MAPK1+inhibitor NC 组 (细胞转染 si-MAPK1 和 inhibitor NC)、si-MAPK1+miR-217 inhibitor 组 (细胞转染 si-MAPK1 和 miR-217 inhibitor), 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 MAPK1 mRNA 和蛋白的表达, MTT 实验检测细胞活力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。(3) 将 circ_100284-WT 或 circ_100284-MUT 报告质粒、MAPK1-WT 或 MAPK1-MUT 报告质粒分别与 miR-NC 或 miR-217 mimic 共转染 KYSE450 细胞 48 h, 使用双荧光素酶报告试剂盒测定荧光素酶活性。细胞转染步骤借助 LipofectamineTM 3000 试剂盒完成。

1.2.4 qRT-PCR 检测 mRNA 的表达 采用 Trizol 试剂提取细胞及组织中的总 RNA, 按反转录试剂盒说明书步骤反转录合成第 1 条 cDNA, 以此 cDNA 为模板按 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。引物和探针由广州复能基因科技有限公司设计和合成, 采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 分析。miR-217 以 U6 作为内参, 其他基因的 mRNA 以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因相对表达量。引物序列如表 1 所示。

1.2.5 RNase R 实验检测 circ_100284 的降解程度 取总 RNA 样本中 2 μg circ_100284, 其中 1 μg 加入 1 μl RNase R, 充分反应后加入 10 \times RNase R 反应缓冲液。随机将反应体系在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴中温热 10 min, 产物用于实时荧光定量 PCR 检测 RNase R 的降解

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列(5'-3')
circ_100284	正向: ATCCTCCATGGCGGCGATGG
	反向: TCGAGTTTCCATAAGAGCCTT
MAPK1	正向: AGTCCTCCTAGAGACCCCTTTACCC
	反向: TACAGCCTTATAGAGTTTCCATC
GAPDH	正向: TATCTTTCCATCAGATCAGCGT
	反向: ATATCAGTAAATTCATTACCAT
miR-217	正向: GTAGGATTATCATTAAAGGAGTCCTAT
	反向: GAGTATCCCAGTCATGTTTATTTT
U6	正向: ATTCATTACAGTTTCATGTTTCC
	反向: GAGTCCATCATTCCAGTCATCCA

MAPK1. 丝裂原活化蛋白激酶1

程度。

1.2.6 FISH实验检测 circ_100284的亚细胞定位 按试剂盒说明书配置相应溶液, 将细胞消化离心后均匀置于玻片上用4%多聚甲醛溶液固定15 min; 加入0.1%预杂交缓冲液A, 室温下反应15 min, 吸弃并用PBS清洗2~3次, 每次5 min; 加入缓冲液C, 对细胞进行封闭30 min后吸弃; 将配置好的探针混合液与样本在37℃下杂交过夜, 弃去探针混合液分别加入预热好的F缓冲液、C缓冲液洗涤; 加入稀释好的DAPI工作液避光染色15 min, PBS洗涤后滴加抗淬灭剂, 在荧光显微镜下对细胞进行观察。

1.2.7 双荧光素酶报告实验验证分子间靶向关系 采用靶向关系预测网站 Circular RNA Interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov>)及 TargetsScan (https://www.targetsScan.org/vert_72/)分别预测 miR-217与 circ_100284、MAPK1之间的结合位点。利用PCR扩增含有 miR-217结合位点的基因的3'UTR序列。将3'UTR克隆到 pMIR-REPORT 荧光素酶载体 pMIR 野生型(wild type, WT)质粒中。PCR扩增基因3'UTR结合位点的突变, 克隆到 pMIR 突变型(mutant type, MUT)质粒中。分别构建 circ_100284-WT 和 circ_100284-MUT 及 MAPK1-WT、MAPK1-MUT。根据 Lipofectamine™3000 试剂说明书分别将 miR-NC 或 miR-217 mimic 与荧光素酶质粒联合转染。转染48 h后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定荧光素酶相对活性。

1.2.8 MTT实验检测细胞活力 根据 MTT 试剂说明书检测 5-FU 对各组细胞活力的影响。取转染48 h的各組 KYSE450 细胞, 消化制成单细胞悬液, 接种于96孔板中, 待细胞贴壁后, 用不同浓度(1、2、5、15、20、30 μg/ml)的5-FU处理细胞以构建5-FU耐药 KYSE450 细胞系(KYSE450-R)。培养48 h后, 加入配

置好的 MTT 溶液于37℃恒温条件下继续培养4 h, 终止后弃去上清液, 加入二甲基亚砷振荡15 min, 采用酶标仪测定490 nm波长处各孔的吸光度(OD), 绘制细胞生存曲线, 并计算5-FU对细胞的半数抑制浓度(half inhibition concentration, IC₅₀)。

1.2.9 Transwell实验检测细胞侵袭能力 将细胞用胰酶消化后计数, PBS清洗, 采用无血清培养基制备单细胞悬液。将 Matrigel 基质胶在冰上与无血清培养基以1:9体积比共同稀释, 预先铺涂于侵袭小室, 置于细胞培养箱中恒温培养2 h。在24孔板中加入完全培养基, 放入小室, 加入单细胞悬液, 下室加入含有20% FBS的DMEM培养液, 置于24孔板中培养24 h。取出小室用PBS清洗后用乙醇固定滤膜, 结晶紫染色后树脂封片。于400倍显微镜下随机选取5个视野计数。

1.2.10 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集各组转染48 h后的细胞, 加入30 μg/ml 5-FU作用48 h, 胰酶消化后用预冷PBS冲洗, 加入结合缓冲液重悬细胞, 加入5 μl Annexin V-FITC 和 PI 染液于室温条件下避光反应20 min, 再用结合缓冲液冲洗细胞以去除未结合的染料和杂质。在1 h内上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.11 Western blotting 检测蛋白表达情况 采用 RIPA 裂解液裂解细胞中总蛋白, 以100:1加入苯甲基磺酰氟后在4℃下、12 000 g离心15 min, 上清中加入上样缓冲液, 100℃煮沸5 min, 置于-80℃保存, 随后进行SDS-PAGE凝胶电泳, 湿法转至PVDF膜后加入5% BSA室温封闭1 h, 将稀释后的一抗(1:500)孵育至PVDF膜上, 4℃过夜; 弃一抗, TBST洗膜后加入稀释后的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗孵育1 h。TBST稀释液洗膜, 配置ECL显色液滴加至膜上, 在凝胶成像仪下拍照, ImageJ 软件进行分析。

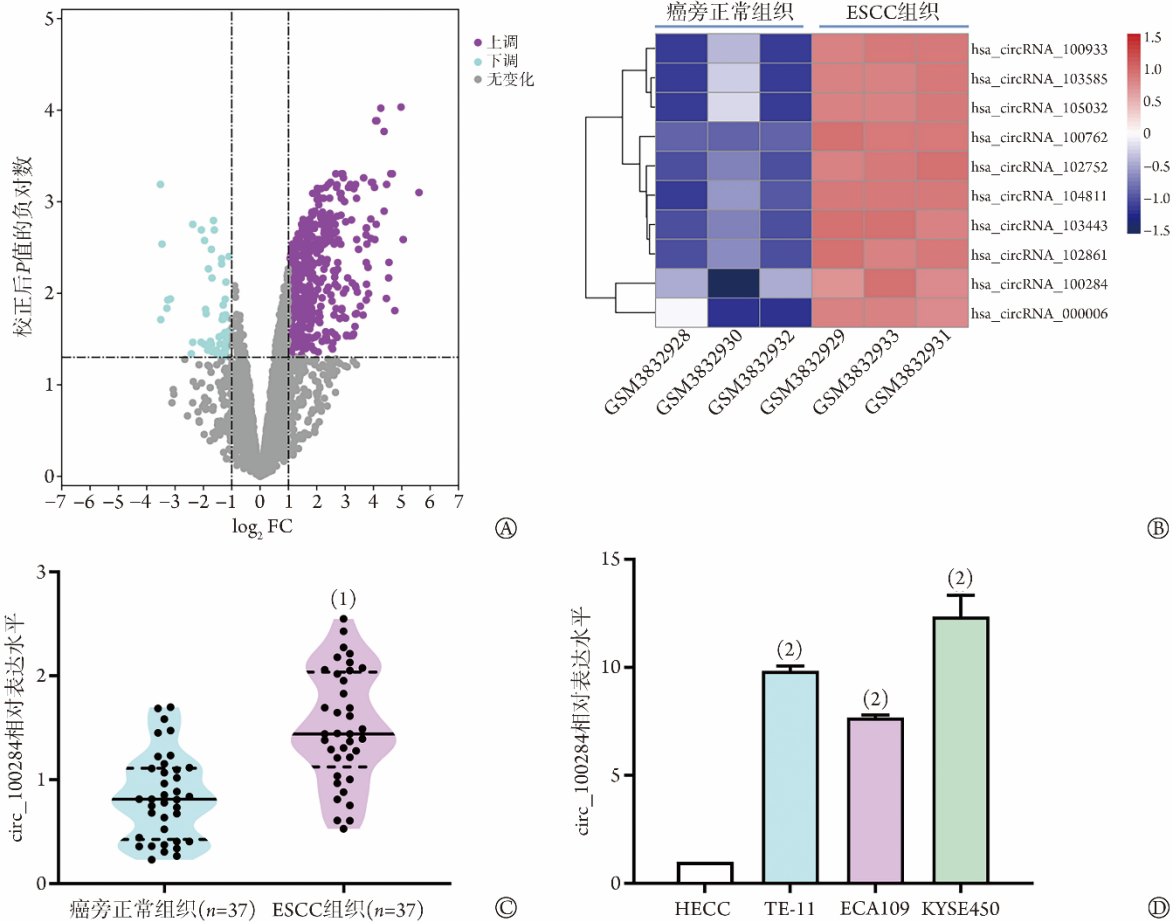
1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。采用 Pearson 相关性分析 miR-217 与 circ_100284 的相关性。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circ_100284在ESCC组织和细胞中的表达 ESCC 相关芯片 GSE131969 中包含566个差异表达的 circRNAs(图1A)。选取 ESCC 中表达上调的前10个 circRNAs 绘制热图(图1B), 根据右侧条带颜色分析(红色表示高表达, 蓝色表示低表达)发现, hsa_circ_100284 在 ESCC 组织中呈高表达。37例 ESCC 患者年

龄 62.3(43.4~76.6)岁, 其中男 23 例, 女 14 例; TNM 分期: I 期+II 期 29 例, III 期 8 例; 淋巴结转移 7 例, 未转移 30 例。qRT-PCR 检测结果显示, 与癌旁正常组织比较, ESCC 组织中 circ_100284 相对表达水平明显升高 ($P < 0.05$, 图 1C)。与健康人食管上皮

细胞系 HEC 比较, ESCC 细胞系 TE-11、ECA109 和 KYSE450 中 circ_100284 相对表达水平明显升高 ($P < 0.05$, 图 1D)。KYSE450 细胞系中 circ_100284 表达上调最为显著, 因此选取 KYSE450 细胞株进行后续实验。



ESCC. 食管鳞状细胞癌; HEC. 健康人食管上皮细胞系; A. GSE131969 芯片数据中差异表达的 circRNAs; B. GSE131969 芯片数据中上调表达差异最显著的前 10 个 circRNAs; C. qRT-PCR 检测 circ_100284 在 ESCC 组织中的表达情况 ($n=37$); D. qRT-PCR 检测 circ_100284 在 ESCC 细胞系中的表达情况; 与癌旁正常组织比较, (1) $P < 0.05$; 与 HEC 细胞系比较, (2) $P < 0.05$

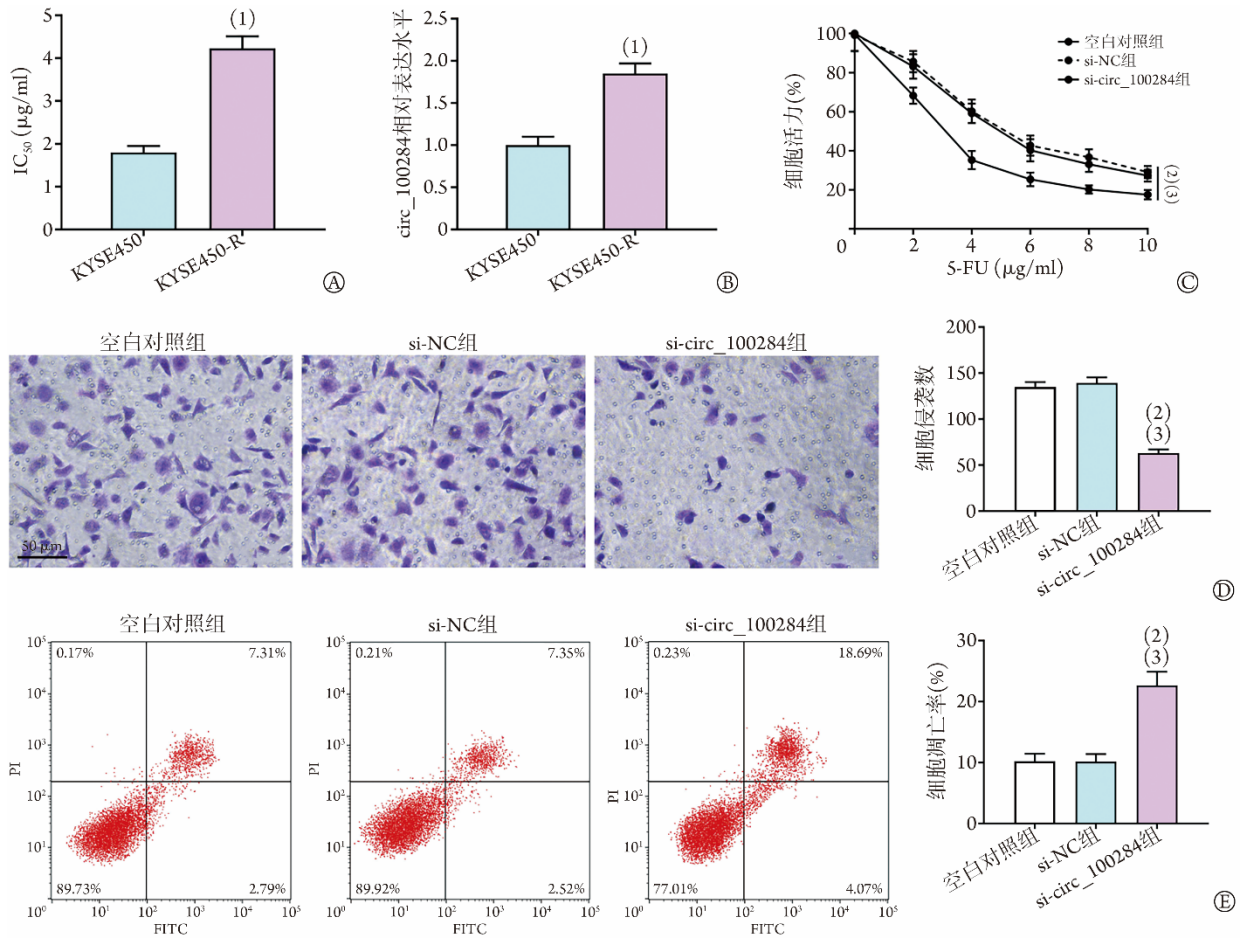
图 1 circ_100284 在 ESCC 组织和细胞系中表达上调

Fig.1 circ_100284 was up-regulated in ESCC tissues and cell lines

2.2 敲减 circ_100284 对 ESCC 细胞侵袭力及其 5-FU 敏感性的影响 MTT 实验和 qRT-PCR 检测结果显示, 与 KYSE450 细胞比较, KYSE450-R 细胞的 IC₅₀ 及 circ_100284 表达水平明显增高 ($P < 0.05$, 图 2A、B)。进一步 MTT 实验检测细胞活力, 结果显示, 在 KYSE450-R 细胞中转染 si-circ_100284, 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-circ_100284 组 KYSE450-R 细胞活力被抑制 ($P < 0.05$, 图 2C)。Transwell 实验检测结果显示, 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-circ_100284 组细胞侵袭数明显减少 ($P < 0.05$, 图 2D)。流式细胞术检测结果显示, 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-circ_100284 组 KYSE452-R 细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.05$, 图 2E)。空白对照组与 si-NC 组 KYSE450-R

细胞活力、细胞侵袭数、细胞凋亡率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 circ_100284 与 ESCC 中 miR-217 的关系 RNase R 实验结果显示, GAPDH mRNA 相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 circ_100284 相对表达水平变化无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 circ_100284 不易被降解, 具有环状结构 (图 3A)。FISH 实验检测结果显示, circ_100284 主要定位于细胞质中 (图 3B), 因此 circ_100284 能够作为 ceRNA 发挥功能。Circular RNA Interactome 预测结果显示, circ_100284 与 miR-217 之间存在互补序列, 表明两者可能存在相互作用 (图 3C)。双荧光素酶报告实验结果显示, circ_100284-WT 和 miR-217 mimic 共转染后相对荧光素酶



HECC. 健康人食管上皮细胞系; A. MTT 实验检测 KYSE450 和 KYSE450-R 细胞的 IC₅₀; B. qRT-PCR 检测 circ_100284 在 KYSE450 和 KYSE450-R 细胞中的表达; C. MTT 实验检测各组 KYSE450-R 细胞活力; D. Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力; E. 流式细胞术检测各组 KYSE450-R 细胞凋亡情况; 与 KYSE450 细胞比较, (1) $P < 0.05$; 与空白对照组比较, (2) $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, (3) $P < 0.05$

图2 敲减 circ_100284 对 KYSE450 细胞生物学行为的影响

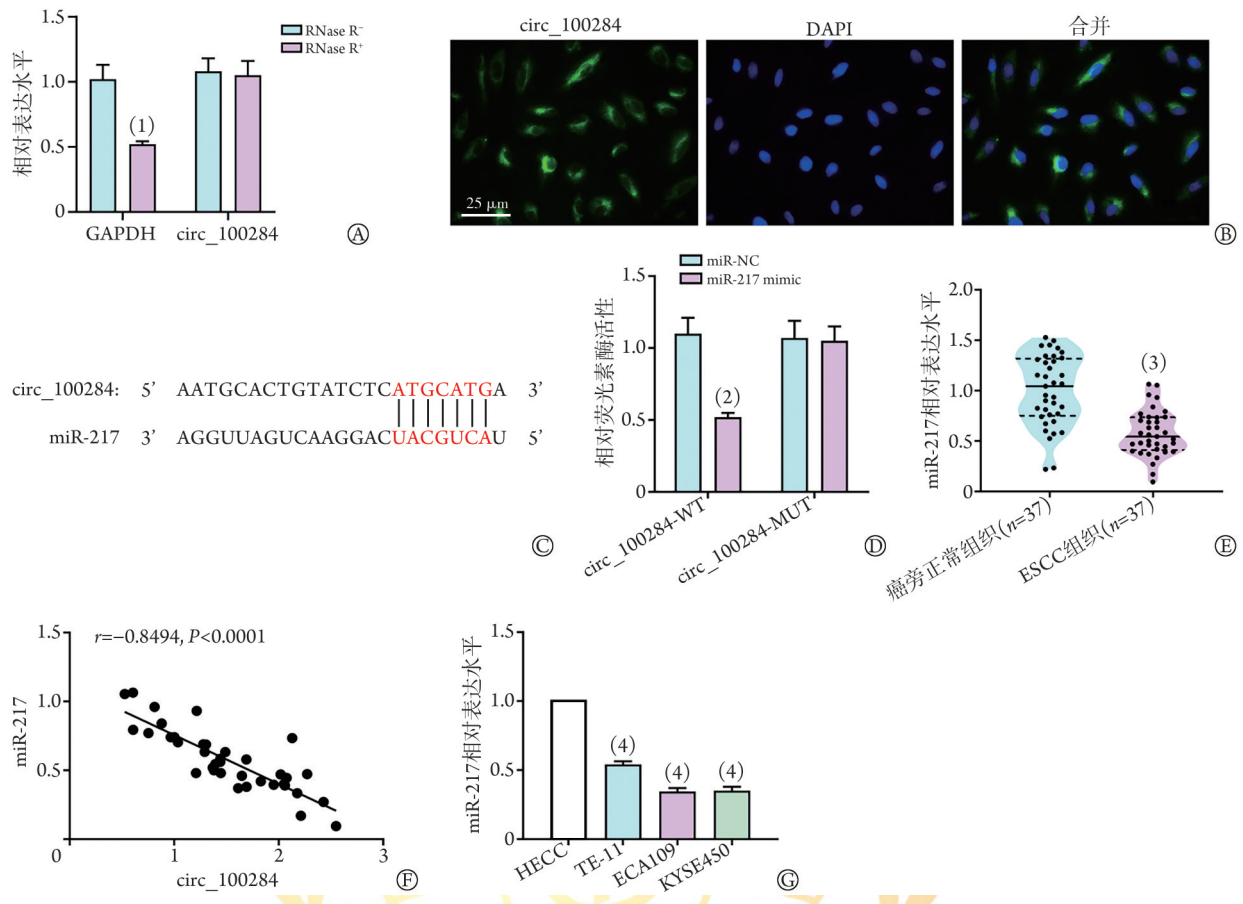
Fig.2 Effects of circ_100284 knockdown on the biological behavior of KYSE450 cells

活性明显降低 ($P < 0.05$), 但 miR-217 mimic 和 circ_100284-MUT 共转染后相对荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$, 图 3D)。与癌旁正常组织比较, ESCC 组织中 miR-217 相对表达水平明显降低 ($P < 0.0001$, 图 3E), 且 miR-217 的表达与 circ_100284 呈负相关 ($r = -0.8494$, $P < 0.0001$, 图 3F)。qRT-PCR 检测结果显示, 与 HEEC 细胞系比较, ESCC 细胞系 TE-11、ECA109 和 KYSE450 中 miR-217 相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$, 图 3G)。

2.4 circ_100284、miR-217 对 ESCC 细胞生物学行为及 5-FU 耐药性的影响 与 KYSE450 细胞比较, KYSE450-R 细胞中 miR-217 表达水平明显下调 ($P < 0.05$, 图 4A)。MTT 实验和 Transwell 实验检测结果显示, 与 pc-Control 组比较, pc-circ_100284 组细胞活力和细胞侵袭数均明显增加 ($P < 0.05$); 与 pc-circ_100284+mimic NC 组比较, pc-circ_100284+miR-217 组细胞活力和细胞侵袭数明显降低 ($P < 0.05$, 图 4B、C)。流式细胞术检测结果显示, 与 pc-Control 组比较, pc-circ_

100284 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); 与 pc-circ_100284+mimic NC 组比较, pc-circ_100284+miR-217 组细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.05$, 图 4D)。

2.5 MAPK1 与 miR-217 的靶向关系验证 在 RNA22 和 miRDB 在线靶向关系预测网站获取 miR-217 的下游靶基因并取交集, 共有 294 个交集靶基因 (图 5A)。KEGG 富集分析结果显示, 交集靶基因在癌症通路中显著富集 (图 5B)。该通路具体富集的 12 个基因为: MAPK10、GNG4、BDKRB2、FN1、EP300、MAPK1、CTNBN1、ITGAV、RAC1、HIF1A、FGF2 和 FGFR2。在 DisGeNET 数据库获取 ESCC (CUI: C1142025) 的疾病风险基因 (ADRA1D、LTA、BRCA1、BRAF)。将癌症通路中的基因与 ESCC 的疾病风险基因通过 String 在线预测网站探究基因间的相互作用关系, 结果显示, MAPK1 和 CTNBN1 与其他基因间均具有较强的关联性 (图 5C)。TargetsCan 预测及双荧光素酶报告实验结果显示, miR-217 与 MAPK1 之间存在特异性结合位点, 并且 MAPK1-WT 和 miR-217



HECC. 健康人食管上皮细胞系; A. RNase R 实验检测 circ_100284 的降解程度; B. FISH 实验检测 circ_100284 的亚细胞定位; C. Circular RNA Interactome 预测 circ_100284 与 miR-217 的互补结合序列; D. 双荧光素酶报告实验结果; E. miR-217 在 37 例 ESCC 组织和癌旁正常组织中的表达; F. Pearson 相关性分析 miR-217 与 circ_100284 的相关性; G. qRT-PCR 检测不同细胞系中 miR-217 的表达; 与 RNase R 组比较, (1) $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较, (2) $P < 0.05$; 与癌旁正常组织比较, (3) $P < 0.05$; 与 HECC 组比较, (4) $P < 0.05$

图3 circ_100284 作为 ceRNA 吸附 miR-21

Fig.3 circ_100284 adsorbs miR-21 as ceRNA

mimic 共转染后相对荧光素酶活性降低($P < 0.05$), 但 MAPK1-MUT 和 miR-217 mimics 共转染后相对荧光素酶活性无明显变化($P > 0.05$), 提示 miR-217 与 MAPK1 存在靶向关系(图 5D)。敲减 MAPK1 后, MAPK1 mRNA 和蛋白相对表达水平明显下调($P < 0.05$), 而 miR-217 inhibitor 能部分逆转 MAPK1 敲减的作用($P < 0.05$, 图 5E、F)。

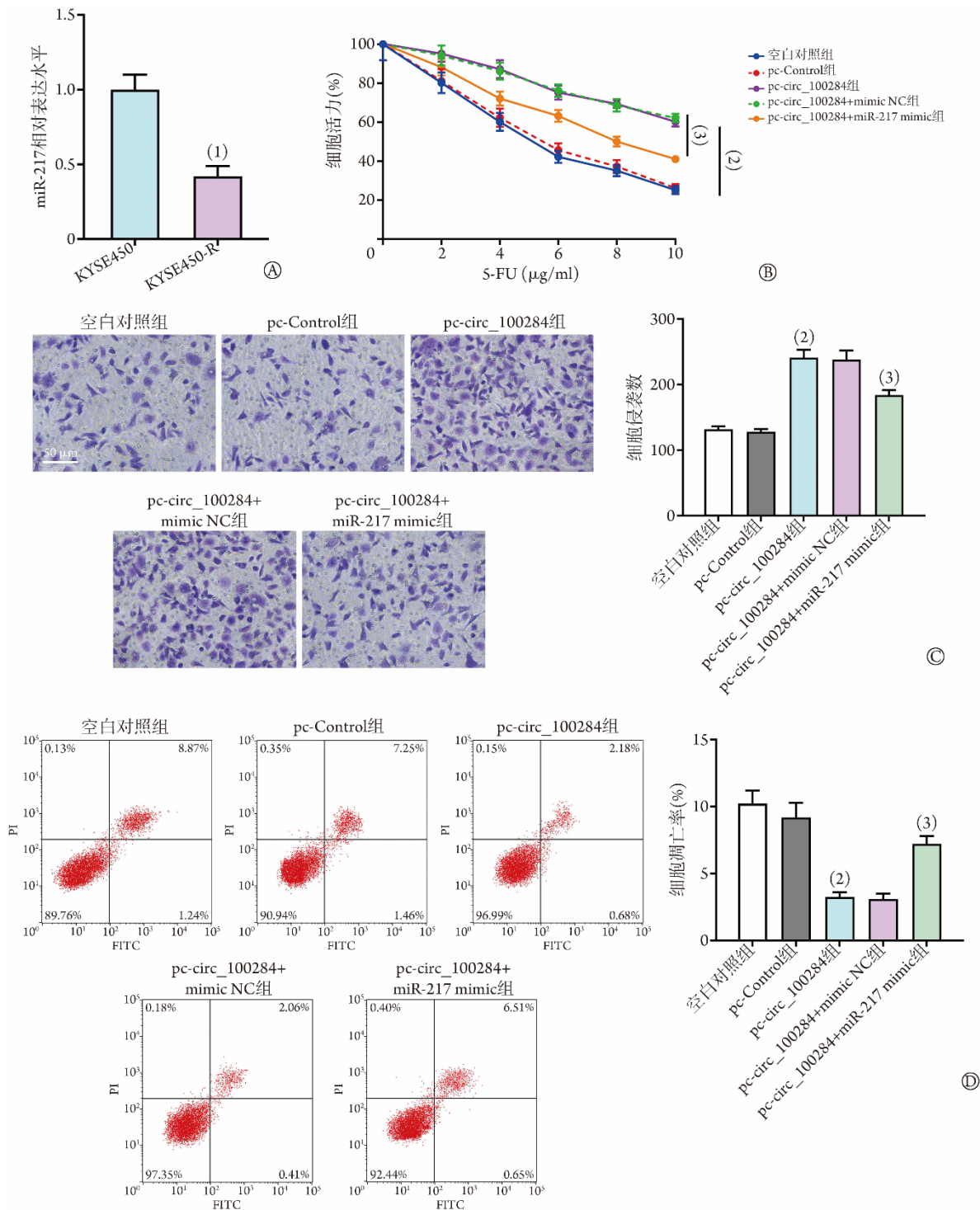
2.6 miR-217、MAPK1 对 ESCC 细胞生物学行为及 5-FU 耐药性的影响 与 KYSE450 细胞比较, KYSE450-R 细胞中 MAPK1 mRNA 和蛋白相对表达水平明显上调($P < 0.05$, 图 6A、B)。MTT 实验检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-MAPK1 组细胞活力明显降低($P < 0.05$); 与 si-MAPK1+inhibitor NC 组比较, si-MAPK1+miR-217 inhibitor 组细胞活力明显增高($P < 0.05$, 图 6C)。Transwell 实验检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-MAPK1 组细胞侵袭数明显减少($P < 0.05$); 与 si-MAPK1+inhibitor NC 组比较, si-MAPK1+miR-217 inhibitor 组细胞侵袭数明显增加($P < 0.05$, 图 6D)。流

式细胞术检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-MAPK1 组细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$); 与 si-MAPK1+inhibitor NC 组比较, si-MAPK1+miR-217 inhibitor 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$, 图 6E)。

3 讨论

本研究探讨了 circ_100284/miR-217 靶向 MAPK1 对 ESCC 细胞侵袭的影响, 以及是否对使用 5-FU 处理的 ESCC 细胞的生存及凋亡产生作用, 发现 circ_100284 能够吸附 miR-217 促进 ESCC 细胞的侵袭能力, 降低 ESCC 细胞对 5-FU 化疗药物的敏感性, 因此干预 circ_100284 的表达有望在 ESCC 化疗中发挥作用。

目前癌细胞的侵袭、转移仍是导致 ESCC 患者死亡的主要原因之一^[19]。研究发现, circRNAs 在 ESCC 的发生发展中起着重要作用^[20-22]。而 circRNAs 的大量研究主要集中于其对 ESCC 发生、发展、侵袭、转移和其他细胞生物学特征的作用^[23]。例如,



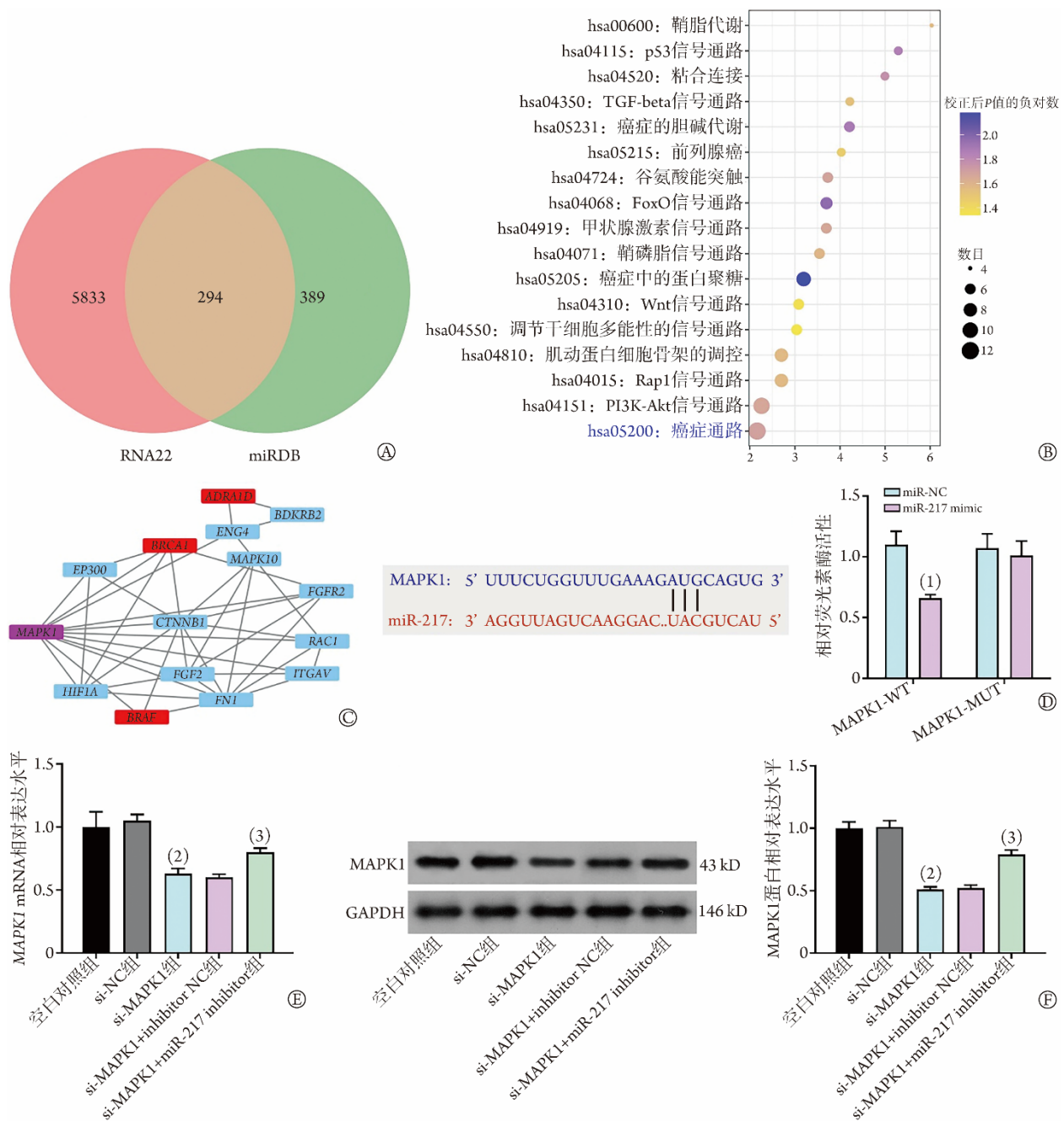
5-FU, 5-氟尿嘧啶; A. qRT-PCR 检测 miR-217 在 KYSE450-R 细胞中的表达; B. MTT 实验检测各组细胞活力; C. Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力; D. 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 与 KYSE450-R 组比较, (1) $P < 0.05$; 与 pc-Control 组比较, (2) $P < 0.05$; 与 pc-circ_100284+miR-217 mimic 组比较, (3) $P < 0.05$

图 4 circ_100284 和 miR-217 对食管鳞状细胞癌细胞生物学行为和 5-FU 耐药性的影响

Fig.4 Effects of circ_100284 on proliferation, invasion and resistance to 5-FU of ESCC cells

过表达 circ_141539 促进了细胞的增殖和侵袭, 在食管鳞癌中起致癌作用^[24]; circDUSP16 基因敲除降低了 ESCC 细胞的生长速度, 进而抑制 ESCC 的进展^[25]。尽管分子生物治疗手段得到广泛应用, 但多年来患者的存活率并未得到明显改善^[26]。因此, 探

讨 ESCC 侵袭的发生机制, 寻找全新的生物分子靶点对于 ESCC 的治疗及预后改善至关重要。本研究通过 NCBI 数据库获取 GEO 芯片, 筛选出在 ESCC 组织中异常表达的 circRNAs, 发现 circ_100284 在 ESCC 中呈高表达。circ_100284 在膀胱癌、肝癌等癌症中



MAPK1. 丝裂原活化蛋白激酶1; A. RNA22和miRDB网站预测结果; B. KEGG通路富集分析; C. 蛋白相互作用分析结果; D. 双荧光素酶分析报告实验结果; E. qRT-PCR检测各组细胞中MAPK1 mRNA表达情况; F. Western blotting检测各组细胞中MAPK1蛋白表达情况; 与mi-NC比较, (1) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-MAPK1+inhibitor NC组比较, (3) $P < 0.05$

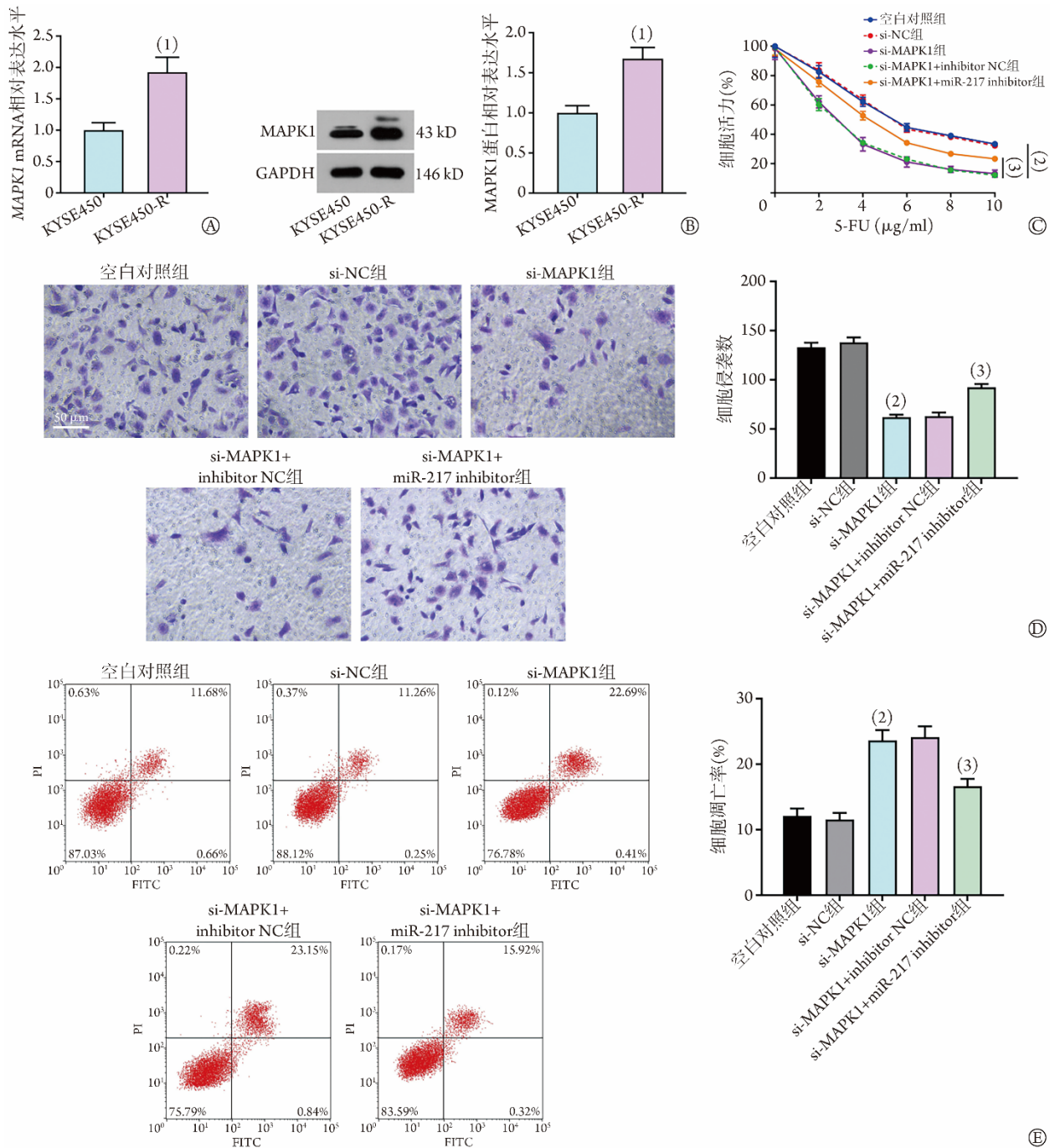
图5 MAPK1是miR-217的直接靶点

Fig.5 MAPK1 is a direct target of miR-217

均发挥促癌作用^[12-14], 能显著促进癌细胞的侵袭及增殖能力。虽然 circ_100284 在 ESCC 中的作用机制尚未阐明, 但其下游分子 miR-217 已被证实与 ESCC 的发展密切相关, miR-217 可抑制 ESCC 细胞的增殖和侵袭, 进而抑制 ESCC 细胞的成瘤作用^[27]。本研究 qRT-PCR 实验验证了芯片数据的分析结果, circ_100284 在 ESCC 组织中呈高表达, 提示其可能作为 ESCC 的促癌因子参与疾病进程; Transwell 实验结果

显示, 敲减 circ_100284 可降低 ESCC 细胞的侵袭能力; FISH 实验及双荧光素酶报告实验验证了 circ_100284/miR-217 之间的靶向关系; 进一步通过一系列挽救实验证实 circ_100284 是通过吸附 miR-217 进而影响 ESCC 细胞的功能, miR-217 过表达能部分逆转 circ_100284 过表达对 ESCC 耐药细胞生物学行为的影响。

为了进一步探究 circ_100284/miR-217 影响 ESCC



MAPK1. 丝裂原活化蛋白激酶 1; 5-FU. 5-氟尿嘧啶; A. qRT-PCR 检测 MAPK1 mRNA 的表达; B. Western blotting 检测 MAPK1 蛋白的表达; C. MTT 实验检测细胞活力; D. Transwell 实验检测细胞侵袭能力; E. 流式细胞术检测细胞凋亡率; 与 KYSE450 细胞比较, (1) $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, (2) $P < 0.05$; 与 si-MAPK1+inhibitor NC 组比较, (3) $P < 0.05$

图 6 miR-217 通过负调控 MAPK1 发挥抑癌作用

Fig.6 miR-217 exerts tumor suppressor effect by negatively regulating MAPK1

耐药的具体机制, 本研究通过 RNA22 和 miRDB 靶向关系在线预测网站获取 miR-217 的下游靶基因, 通过 DAVID 数据库进行 KEGG 的功能通路富集分析和疾病风险基因蛋白相互作用分析筛选出 miR-217 的下游靶基因 MAPK1。MAPK1 作为激活 MAPK 通路的重要蛋白之一, 能够参与细胞增殖、应激、炎症、分化、功能同步化、转化、凋亡等重要功能^[28]。研究发现,

miR-574-3p 通过调节 MAPK1 来抑制 ESCC 细胞的增殖和侵袭^[29]。因此, 本研究选择 MAPK1 作为 circ_100284/miR-217 的下游靶点, 进一步证实了 miR-217 能够调控 MAPK1 mRNA 和蛋白的表达, 通过敲减 MAPK1 能够抑制耐药 ESCC 细胞侵袭, 而抑制 miR-217 能部分逆转这一趋势, 揭示了 circ_100284/miR-217/MAPK1 调控轴在 ESCC 治疗中的意义。

化疗是治疗 ESCC 的重要临床方法, 它能杀死肿瘤细胞, 减少肿瘤复发^[30]。5-FU 是一种常用的治疗 ESCC 的化疗药物, 然而, 5-FU 耐药性限制了其临床应用^[31]。5-FU 耐药的分子机制相当复杂, 涉及许多基因的表达变化^[5]。有研究发现, MAPK1 蛋白水平下调后细胞 SGC7901/5-FU 的生长抑制率明显高于对照组, 提示 MAPK1 可影响癌细胞株对 5-FU 治疗的敏感性^[32]。由此推测, circ_100284 可能与 5-FU 敏感性相关, 其能通过吸附 miR-217 降低 MAPK1 的表达, 从而影响 ESCC 细胞对 5-FU 的敏感性。

综上所述, 本研究揭示了 circ_100284/miR-217/MAPK1 轴在 ESCC 进展中的机制, 证实了 si-circ_100284 在 ESCC 细胞中的抑癌作用及其在促进细胞 5-FU 敏感中的作用, 为 ESCC 的治疗提供了一定的理论基础和新的有效靶点。但本研究存在不足之处, 如未进行体内实验等, 今后需进一步完善。

【参考文献】

- Li ZY, Li HF, Zhang YY, *et al.* Value of long non-coding RNA Rpph1 in esophageal cancer and its effect on cancer cell sensitivity to radiotherapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(15): 1775-1791.
- 曹莎莎, 李军扩, 段丽娟, 等. hsa_circ_0064369 在食管鳞癌组织和细胞中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(2): 232-236.
- Peng C, Cohen DJ. Advances in the pharmacotherapeutic management of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2021, 22(1): 93-107.
- 王萌, 张阳阳, 刘静. 基于生物信息学与相关实验探究 ACLY 与食管癌的关系[J]. *医学新知*, 2023, 33(5): 334-342.
- Cui Y, Yang D, Wang W, *et al.* Nicotinamide N-methyltransferase decreases 5-fluorouracil sensitivity in human esophageal squamous cell carcinoma through metabolic reprogramming and promoting the Warburg effect[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(8): 940-954.
- Li PF, Zhang ZX, Yuan X, *et al.* Hsa_circ_0001696 modulates cell proliferation and migration in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 154.
- 张玉月, 朱亚飞, 高丽娜, 等. 环状 RNA BRAF_2 在子痫前期胎盘滋养细胞增殖和凋亡中的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 374-382.
- 农与乐, 吕叶辉. 环状 RNA 在糖尿病创面愈合中的作用机制研究进展[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2023, 39(5): 487-490.
- 范吉林, 朱婷婷, 田晓玲, 等. 基于房颤中 circRNA-miRNA-mRNA 网络构建和免疫细胞浸润的生物信息学分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(6): 1535-1545.
- Khanipouyani F, Akrami H, Fattahi MR. Circular RNAs as important players in human gastric cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(1): 10-21.
- Zhou D, Dong L, Yang L, *et al.* Identification and analysis of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in hepatocellular carcinoma[J]. *IET SystBiol*, 2020, 14(6): 391-398.
- Huang ZM, Wang H, Ji ZG. CircRNA-100284 activates aurora kinase B by inducing methylation of HSP70 via microRNA-217 to promote proliferation of bladder cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(3): 703-712.
- Dai X, Chen C, Yang Q, *et al.* Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 454.
- Xue J, Liu Y, Luo F, *et al.* Circ100284, via miR-217 regulation of EZH2, is involved in the arsenite-accelerated cell cycle of human keratinocytes in carcinogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(3): 753-763.
- Li RQ, Ren Y, Liu W, *et al.* MicroRNA-mediated silence of onco-lncRNA MALAT1 in different ESCC cells via ligand-functionalized hydroxyl-rich nanovectors[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(7): 2521-2530.
- Wang XY, Li M, Wang ZQ, *et al.* Silencing of long noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 inhibits proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 3925-3935.
- Heckmann D, Maier P, Laufs S, *et al.* The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(3): 604-616.
- Zabihula B, Yiliyasi M, Lu Y, *et al.* MicroRNA-490-3p inhibits proliferation and stimulates apoptosis of ESCC cells via MAPK1 downregulation[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 3170-3176.
- Liu W, Li M, Chen X, *et al.* Erratum: microRNA-373 promotes migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP3 expression[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(2): 618-620.
- Shen JF, Ge JF, Zheng SY, *et al.* Integrative analysis of differential circular RNA and long non-coding RNA profiles and associated competing endogenous RNA networks in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *FunctIntegr Genomics*, 2021, 21(1): 125-138.
- Shi N, Shan B, Gu B, *et al.* Circular RNA circ-PRKCI functions as a competitive endogenous RNA to regulate AKT3 expression by sponging miR-3680-3p in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10021-10030.
- Pan Z, Lin J, Wu D, *et al.* Hsa_circ_0006948 enhances cancer progression and epithelial-mesenchymal transition through the miR-490-3p/HMGA2 axis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 11937-11954.
- Li X, Song L, Wang B, *et al.* Circ0120816 acts as an oncogene of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting miR-1305 and releasing TXNRD1[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 526.
- Liu ZH, Yang SZ, Li WY, *et al.* CircRNA_141539 can serve as an oncogenic factor in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-4469 and activating CDK3 gene[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(8): 12179-12193.
- Ma L, Li H, Lin Y, *et al.* CircDUSP16 contributes to cell development in esophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-497-5p/TKTL1 axis[J]. *J Surg Res*, 2020, 260(14): 64-75.
- Song Y, Wang X, Wang F, *et al.* Identification of four genes and biological characteristics of esophageal squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 123.
- Wang Q, Yang L, Fan Y, *et al.* Circ-ZDHHC5 accelerates esophageal squamous cell carcinoma progression via miR-217/

- ZEB1 axis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 17(8): 570305.
- [28] Deng Y, Zhang J, Sun X, *et al.* miR-132 improves the cognitive function of rats with Alzheimer's disease by inhibiting the MAPK1 signal pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 159.
- [29] Jin LL, Zhang SJ, Lu GX, *et al.* miR-574-3p inhibits proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting FAM3C and MAPK1 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(5): 318-327.
- [30] Xue W, Shen Z, Li L, *et al.* Long non-coding RNAs MACC1-AS1 and FOXD2-AS1 mediate NSD2-induced cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 592-602.
- [31] Miyawaki Y, Nakajima Y, Kawada K, *et al.* Efficacy of docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil chemotherapy for superficial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30(2): 1-8.
- [32] Xiong HL, Zhou SW, Sun AH, *et al.* MicroRNA-197 reverses the drug resistance of fluorouracil-induced SGC7901 cells by targeting mitogen-activated protein kinase 1[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5019-5025.

(责任编辑: 纪方方)



解放军医学杂志®