

· 生物技术与方法 ·

条纹斑竹鲨肝脏环形 RNA 的筛选、鉴定及功能分析

覃萍, 张文杰, 吕正兵

浙江理工大学 生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018

覃萍, 张文杰, 吕正兵. 条纹斑竹鲨肝脏环形 RNA 的筛选、鉴定及功能分析. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3528-3541.

QIN P, ZHANG WJ, LÜ ZB. Identification and functional characterization of circular RNAs in the liver of whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3528-3541.

摘要: 为筛选和验证条纹斑竹鲨肝脏中环形 RNA (circRNA) 及探究其在肝癌细胞 HepG2 中过表达对肝癌细胞增殖、迁移能力的影响, 本研究主要进行了两项实验: 对条纹斑竹鲨肝脏 circRNA 进行高通量测序和预测, 随后设计正、反向引物验证其真实性; 构建 circRNA 过表达载体, 将其瞬时转染进肝癌细胞 HepG2, 进行 CCK-8 和划痕实验来评价其对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响。结果显示: 预测到有 4 558 条 circRNAs, 并确认了 14 条 circRNAs 的真实性; qRT-PCR 实验表明在肝癌细胞 HepG2 中能瞬时过表达 circRNA 13-566、circRNA 4-475、circRNA 5-402、circRNA 294-177、circRNA 30-219; 且 CCK-8 和划痕实验显示, 这 5 条 circRNAs 过表达后, 均能不同程度地抑制肝癌细胞的增殖和迁移能力, 其中 circRNA 4-475、circRNA 294-177 作用尤为显著。上述结果为深入研究条纹斑竹鲨肝脏中 circRNA 及其在肝再生、肝癌治疗方面的功能提供了新思路 and 基础。

关键词: 条纹斑竹鲨; circRNA; 鉴定; HepG2; 功能

Received: January 22, 2022; **Accepted:** May 10, 2022; **Published online:** May 12, 2022

Supported by: Non-Profit Scientific Research Project of Zhejiang Province, China (LGF19H140002); Entrepreneurship Foundation of Zhejiang University of Science and Technology (11612932618290)

Corresponding author: LÜ Zhengbing. E-mail: zhengbingl@126.com

基金项目: 浙江省公益性科研项目 (LGF19H140002); 浙江科技大学创业基金 (11612932618290)

Identification and functional characterization of circular RNAs in the liver of whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*)

QIN Ping, ZHANG Wenjie, LÜ Zhengbing

College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: This study aims to identify the circular RNAs (circRNAs) in the liver of whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*) and to explore the effect of the overexpression of circRNAs on the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. We conducted high-throughput sequencing for prediction of the circRNAs and then designed forward and reverse primers to verify them. Further, we constructed overexpression vectors for transient transfection of circRNAs into HepG2 cells. Finally, we employed CCK-8 assay and scratch assay to measure the proliferation and migration of the treated HepG2 cells. A total of 4 558 circRNAs were predicted, among which 14 circRNAs were confirmed. The qRT-PCR showed that circRNA 13-566, circRNA 4-475, circRNA 5-402, circRNA 294-177, and circRNA 30-219 were transiently overexpressed in HepG2 cells. The overexpression of these five circRNAs inhibited the proliferation and migration of HepG2 cells to varying degrees, and circRNA 4-475 and circRNA 294-177 had especially notable effect. This study provided a basic database of circRNA genes that particularly active in whitespotted bamboo shark liver and demonstrated with functional studies of these circRNAs potentially involved in normal and malignant liver cells.

Keywords: whitespotted bamboo shark; circRNA; identification; HepG2; function

环形 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种通过共价键磷酸二酯键结合形成的一类内源的小分子 RNA, 其缺少 5'端帽子结构和 3'端 poly(A), 且呈闭合的环形结构^[1-2]。circRNA 于 1967 年首次被发现, 当时被认为是一种错误剪接的产物^[3], 未受到太多关注。在之后五六十年的研究中, circRNA 陆续在酵母菌^[4]、古生菌^[5]、哺乳动物大脑^[6]、斑马鱼^[7]、大小鼠和人体的心脏^[8]等多种细胞体和物种中被鉴定出来。circRNA 作为一种非编码 RNA, 其种类繁多、分布广泛、且具有作为 miRNA 的海绵、调控基因表达、翻译蛋白质、医学疾病诊断的标志与治疗靶点^[9-12]等多种功能。circRNA 受到了

越来越多研究者的关注, 如今已经成为新的研究热点。

circRNA 与结直肠癌、胃癌、肝癌、乳腺癌等诸多癌症有着密切联系, 在肿瘤细胞侵袭、增殖和凋亡过程的调控网络中起关键作用, 其主要调控机制是 circRNA 信号传递通路及 circRNA-miRNA 相互靶定, 通过与 miRNA 靶点相互结合, 来实现对肿瘤细胞的转移、增殖和分化的调控。越来越多的实验发现 circRNA 在肝细胞肝癌发生和发展过程中发挥着极其重要的作用^[13-19]。

条纹斑竹鲨作为软骨鱼类的重要一员, 是良好的模式生物。与其他动物相比, 鲨鱼很少

患肿瘤或其他疾病。其肝脏体积占内脏总量的75%，远高于其他动物（通常为5%–7%），由此推测条纹斑竹鲨肝脏内的成分在疾病及应激过程中皆起着重要作用^[20-22]。一些研究已从条纹斑竹鲨中分离并克隆了与免疫调节相关、肝再生以及其他肝脏疾病的刺激因子，然而其肝脏的 circRNA 却鲜有报道研究。同为小分子 RNA 的 miRNAs，几乎把控和调节着全部生物及其代谢功能，且其在条纹斑竹鲨肝脏中含量丰富，通过研究与 miRNA 相互作用的 circRNA，可进一步在转录水平探究 circRNA 的功能^[22-32]。

本研究通过高通量测序获得条纹斑竹鲨肝脏潜在的 circRNA，实验验证真实性并对其功能进行研究，探究其过表达对肝癌细胞 HepG2 的增殖、迁移能力的影响，为进一步研究鲨鱼肝脏 circRNA 在肝再生和肝癌发生、发展过程潜在的生物学功能提供参考依据，并为探究肝癌治疗机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条纹斑竹鲨购自福建省漳州市东山县的海一水产养殖有限公司的健康鲨鱼。使用 MS-22 鱼用麻醉剂配制麻醉用海水将鱼麻醉后解剖，解剖实验获得浙江理工大学实验动物伦理委员会批准（编号 20200820-07）。实验提取条纹斑竹鲨肝脏，一部分肝脏送至上海云序生物科技有限公司测序，获得 circRNA 相关数据及测序结果；另一部分肝脏自行提取 RNA，以备后续验证和功能验证使用。

1.2 实验方法

1.2.1 circRNA 高通量测序与生物信息学分析

首先提取鲨鱼肝脏总 RNA，纯度合格后对其进行预处理。使用 Cloudseq circRNA Enrichment Kit (Biotech Inc., Shanghai, China) 富

集 circRNA，而后使用 NEBNext[®] ULtra[™] II Directional RNA Library Prep Kit (New England BioLabs, Inc., Massachusetts) 预处理 RNA，完成后开始构建 RNA 测序文库。其次通过 BioAnaLyzer 2 100 system (Agilent Technologies, Inc.) 对测序文库进行质控和定量，最后采用 Illumina HiSeq 4 000 测序仪测序进行 150 bp 双端测序，生成的原始 reads (即 raw data，是测序所得到的原始图像数据经过 base calling 转化为序列数据)。原始 reads 的分析首先经 Q30 质控，cutadapt (v1.9.3) 软件去接头，而后比对至参考基因组 (ASM401019v1) 上并运用 Find_CIRC 软件对 circRNA 进行预测，最后使用总匹配 reads 数对每个样品的反向剪接 reads (junction reads) 进行标准化。

1.2.2 circRNA 鉴定

circRNA 鉴定步骤为：第一步，采用 simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP419) 提取肝脏总 RNA；第二步，使用 Easy Quick RT Master Mix 反转录试剂盒 (康为世纪, CW2019M) 将总 RNA 逆转录成浓度为 1 μg 的 cDNA；第三步，利用 primer 5.0 和 Oligo 7.0 软件设计一对跨越剪切位点 (junction site) 上下游的反向引物 (也称收敛性引物)，以保证扩增区域覆盖剪接位点，并根据原序列设计一组正向引物 (也称发散性引物)，共两向两组引物 (以下均称正向、反向引物，见表 1)；第四步，进行 PCR 反应扩增目的 circRNA 片段。PCR 反应所用酶为 *Taq* 酶 (BBI, B639293)，50 μL PCR 反应体系中加入 25 μL *Taq* PCR Master Mix，4 μL DNA 模板 (tempLate)，2 μL 引物 F (10 μmol/L)，2 μL 引物 R (10 μmol/L)，最后 SteriLized ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件为：Pre-duration 预变性 (94 °C 4 min)；34 个循环的扩增，包括变性 (94 °C 30 s)、退火

表 1 14 条 circRNAs 正、反向引物的 RT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of forward and reverse primers for RT-PCR of 14 circRNAs

CircRNA names	Divergent PCR primers (forward primer, 5'→3')	Product size (bp)	Convergent PCR primers (reverse primer, 5'→3')	Product size (bp)
8-517	F: AGCCAGTTTTCTGATACGTT R: CCAGGAAATTTGAGTACGAT	295	F: AACAAGGCCAAAGGTGG R: CCGCTCGAGTTGCGATTGCTGAGGTG	353
38-801	F: CGACAATGTGGCTGAATCACC R: GGTAGATATCTGCACAGACCCA	605	F: TCTCAAGGCCAGTTGACCC R: TCCTTCTAAACCTCCGGTGT	450
15-1 452	F: GAGTGGATGAAGCTGGTCT R: ACTGTTGGAGGAGGGATG	867	F: AATACCCAGTCCATCCCTC R: GGTTTCACAGTTGCTCCAT	1 080
13-566	F: TCTAAATGGGTCCAGTCATGC R: ACTCCTGTCCTGTCTACTTT	554	F: AGAACCCCTAACTGTAAACCAC R: AGGCAAATAACTGCTCGT	379
185-1 702	F: GTCCCATTTCAAGCACGTT R: AGCACGAGGAGATATTACACT	828	F: TCTCAAACAGAACGGGCTCT R: GGAACCTATGTCAATAATGCCCTT	737
10-1507	F: CAATCAACTGTTTCGCTGA R: GATGCCATACTGATTTAACC	1 179	F: CACGGTTAAATCAGTATGGC R: TTGCTGCTAGAGCTTTCGAC	752
11-467	F: AAACGTGAAACAGTTCTGC R: GCTATTTGTCCCAGCGTTC	389	F: TAGCCTTGCAACAGTATCCAA R: AGTCTCTGTGGATAATGCCTC	253
8-731	F: TCACCAATAGACGGGTAAGT R: TAGTGAAAGTTGGCGAAAGC	628	F: CACTGTCTTCCCCATCCAA R: CAGTTGAATACTTACCCGTCT	361
9-859	F: CTTCGACTTTTCCAGATCCCC R: TTCTTCCCATCCAGTGGCATA	809	F: CAACAACCTCTAACTACGAGCAA R: CAACTTTCTCCGAAGTAGCG	462
11-474	F: TTCCCAAGATCCTCCGACCAC R: CCCTTGCCCAGGTGAATGTCT	276	F: GTCCTTCCAGCGATGTCCAGT R: CTCATGCCCTGGGGTACCAC	408
7-472	F: AATCGACCAATCAGAATCCAC R: GCACAACATTTACTACCCTG	267	F: TGCATTTGTCCTGACGAGT R: GGAATGTCAAGTGTCAAAGGGA	472
4-475	F: AGTTTAGTGAGACGCAAACCT R: TCCTTCCCATGATGTCACAG	206	F: ACACCAGTGAAGTGAAAGTGGA R: GCTGCTGAATGGATCATTTTGG	471
5-640	F: AAGCCATTAATTCATTGTACGAG R: AAATCTGCTTTGAGTTGGCTAC	337	F: TTAGTGCAACTTCGTAGCC R: TTTTCACTGGACTGCCAT	455
5-402	F: AAACAAGGCCAGATCTGAGGTGA R: TCTCATTGATGGCCTCTCCAC	402	F: GTTGTTGGCACTACCCAGG R: GCTGCGGTGATAGTAGAACCAAG	395

F: sense primer; R: reverse primer.

(58 °C 30 s)、延伸(72 °C 60 s); 再次延伸 (72 °C 10 min), 最后反应结束可 10 °C 永久保温或保存在 4 °C 冰箱。随后 PCR 产物用 1%浓度的琼脂糖凝胶鉴定扩增结果, 并结合核酸测序, 检验纯化的扩增片段是否与预测序列一致。

1.2.3 circRNA 过表达载体的构建

将 Zhang 等^[32]和本研究验证的共 21 条 circRNAs 全长进行酶切引物设计, PCR 扩增目

的基因采用高保真 KOD-Plus-Neo 酶, 反应体系如下: 10×PCR 缓冲液 for KOD-Plus-Neo 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 5 μL, primers F (10 μmol/L) 1.5 μL, primers R (10 μmol/L) 1.5 μL, KOD-Plus-Neo 1 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 29 μL。反应的条件采用两步法: 94 °C 2 min 预变性, 第一步 5 个循环 (98 °C 10 s; 68 °C 15 s), 第二步 30 个循环

(98 °C 10 s; 60 °C 30 s; 68 °C 30 s), 最后延伸 68 °C 7 min。采用 *Apa* I 和 *Eco*R I 两个酶切位点对载体和目的基因进行双酶切, 清洁回收酶切产物及连接酶连接, 通过转化 DH5 α 菌株克隆筛选和扩大培养, 将目的基因构建到 circRNA 过表达载体 PLC 中。酶切鉴定和核酸测序验证成功构建过表达载体后用 Omega 的无内毒素质粒小量提取试剂盒 II 提取重组质粒。分别将过表达组 (构建好的 5 个过表达重组质粒) 和 NC 组 (PLC 空载质粒), 即 PLC-circ13-566、PLC-circ4-475、PLC-circ5-402、PLC-circ294-177、PLC-circ30-219 转染进生长达 70%–90% 汇合度的肝癌细胞 (HepG2) 中, 每组设 3 个孔, 每孔加入 125 μ L Opti-MEM 培养基, 2.5 μ g 质粒 DNA, Lipo8000™ 转染试剂 4 μ L, 置于细胞培养箱中培养约 24–48 h 后, 观察荧光和进行后续实验。

1.2.4 qRT-PCR 实验检测肝癌细胞中 circRNA 表达效率

qRT-PCR 实验选定了 5 个过表达载体酶切鉴定时目的 circRNA 表达量靠前的 circRNAs, 检测这 5 个过表达实验组能否在肝癌细胞中过表达相应 circRNA 以及其与对照组在肝癌细胞中的表达效率。重组质粒转染 48 h 后, 收集细胞, 提取 RNA 进行 qRT-PCR 检验 circRNA 过表达载体在肝癌细胞中表达 circRNA 情况, 将转染后细胞按用 Trizol 消化提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 利用 primer 5.0, 在 circRNA 连接点两侧设计特异性 qPCR 引物, 内参是 18S rRNA 基因 (表 2)。qRT-PCR 反应运用艾科瑞生物的 SYBR® Green Pro *Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含 ROX), 20 μ L 反应条件为: 2 \times SYBR® Green Pro *Taq* HS Premix (ROX Plus) 10 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 引物 F (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 0.4 μ L, RNase free water 7.2 μ L。

混匀、离心后, 放入定量 PCR 仪 (ABI 7500) 中进行如下程序的反应: 第一进行 95 °C 预热 30 s, 第二进行 40 个循环 (95 °C 5 s; 60 °C 30 s) 进行变性和退火, 第三再进行 (95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s) 变性、退火和延伸, 在最后延伸阶段进行检测荧光强度收集信号。结束后根据 qPCR 反应得出的各孔 C_t 值 (OE-circRNA 过表达组、CTRL 组) 每组各设置 3 个复孔, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 差值比较法, 计算出 OE-circRNA 过表达组和 CTRL 组的表达差异, 得出 5 个 circRNAs 在肝癌细胞中的相对表达量, 检验过表达组的表达水平。

1.2.5 增殖、迁移实验探究 circRNA 潜在功能

验证 circRNA 能在肝癌细胞中过表达后便进行细胞水平功能试验, 验证过表达的 circRNA 对肝癌细胞的影响分别通过 CCK-8 和划痕实验。CCK-8 实验中取成功转染 5 个过表达质粒和对照质粒转染细胞, 铺板至 96 孔板中每孔加入 100 μ L, 2 000 个细胞, 每个实验组和对照组设置 5 个复孔, 设置 0、24、48、72 h 和 96 h 时间点, 第 2 天细胞贴壁后计为 0 h, 以 10 μ L/孔的 CCK-8 溶液加到 96 孔板

表 2 QRT-PCR 引物序列

Table 2 Primers of QRT-PCR

Primer name	Primer sequences (5'→3')
q-PLC-circ13-566-F	GGGGACACTGTACTTCGT
q-PLC-circ13-566-R	AGTTAGGGTCTGCTTGG
q-PLC-circ4-475-F	GCACGGCACAGAATCCC
q-PLC-circ4-475-R	TGCTCGCCCTGGCTAAT
q-PLC-circ5-402-F	TCAAACCGGGATTACAG
q-PLC-circ5-402-R	TTGGCTCATCGTCACAT
q-PLC-circ294-177-F	ACGTCACGAAGTGATGT
q-PLC-circ294-177-R	TGCAGGTTCTGGATAAA
q-PLC-circ30-219-F	ATGCTGGAAACAGACGC
q-PLC-circ30-219-R	AAAAGCACTTTGTGACCTCT
18S rRNA-F	GGGCCACTTGGCATAACA
18S rRNA-R	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT

中; 培养箱黑暗孵育 3 h 后取出, 于酶标仪上检测 450 nm 处的 OD 值。

划痕实验中取成功转染 5 个过表达质粒和对照质粒转染细胞, 以每孔 2×10^6 个细胞铺板于 6 孔板, 细胞长到约 90% 密度, 将培养基换为无血清培养基, 培养 12 h; 次日用 20 μ L 的枪头, 尽可能垂直在孔内画 3 条直线, 弃去培养基, 用磷酸缓冲盐 (phosphate-buffered saline, PBS) 清洗脱落的细胞 2 次, 再加入无血清培养基, 按 0、12 h 取样, 拍照, 并测量划痕宽度, 统计分析。

circRNA 最令人熟知的一个功能便是充当 miRNA 的海绵, 分析 microRNA sponge 对探索 circRNA 功能有重大意义, 利用网络在线工具 RNAhybrid 和 miRanda 软件将细胞实验探究中作用显著的两条 circRNAs 与先前本实验室 Ge 等^[31]在条纹斑竹鲨肝组织中鉴定的能与 GSTP1 3'UTR 区域结合的 3 个 miRNAs (dre-let-7a, ipu-miR-143 和 hsa-miR-143-3p_R+1_1ss21CA), 进行 microRNA sponge 预测, 通过软件预测, 获取 circRNA 可能结合的 miRNA。

2 结果与分析

2.1 circRNA 的鉴定

Zhang 等^[32]测序产生了 6 412 万个原始 reads, 通过软件预测获得 4 558 条至少具有一个 BSJ reads 的 circRNAs。本研究在 Zhang 等^[32]基础上对预测到的 circRNAs 再次进行 PCR 扩增验证真实性, 最终成功鉴定出 14 条 circRNAs, 鉴定结果如图 1 所示。图中泳道 1–28 分别为 14 条 circRNAs 正向和反向 PCR 的结果, 从左到右依次为 circRNA 8-517、circRNA 38-801、circRNA 15-1452、circRNA 13-566、circRNA 185-1702、circRNA 10-1507、circRNA 11-467、circRNA 8-731、circRNA 9-859、circRNA 11-474、

circRNA 7-472、circRNA 4-475、circRNA 5-640、circRNA 5-402 的正、反向 PCR 扩增的条带。图上结果可知 14 条 circRNAs 的正反向片段均能稳定地扩增出预期大小的目的条带, 并且大部分序列都能扩增出与预期大小一致且转录量高、单一的特异性条带, 最后经过 Sanger 测序检验, 结果也证实 PCR 扩增条带与预测到的核酸序列是一致的。可见这些 circRNAs 在鲨鱼肝脏中广泛存在且表达量高, 也为接下来的功能验证提供了理论基础。

2.2 circRNA 过表达对肝癌细胞中功能的影响

2.2.1 靶定目的 circRNA 酶切鉴定结果

将先前和本研究验证的共 21 条 circRNAs 设计酶切引物扩增, 并通过双酶切法将 circRNAs 重组至过表达载体 PLC 上, 形成过表达相应 circRNA 的重组载体。鉴定结果显示有 14 条 circRNAs 成功构建到过表达载体上, 通过双酶切对和引物双向核酸测序对结果进行验证 14 条 circRNAs 是否成功构建到过表达载体上。酶切验证结果如图 2 所示, 图上可见, 14 个 circRNAs 过表达质粒经酶切后, 在相应的位置均出现了与目的条带大小一致的条带及相对应大小的质粒条带, 且目的条带清晰。其中用于后续功能验证的 5 条 circRNAs: circRNA 13-566、circRNA 4-475、circRNA 5-402、circRNA 294-177、circRNA 30-219 通过 Sanger 测序结果所得序列与目的片段进行对比, 序列完全一致, 测序序列附在文章最后 (附表 1, 详见《生物工程学报》网络版附件), 其中标红部分为目的片段序列, 而目的 circRNA 的长度依次分别为: 574 bp、493 bp、407 bp、188 bp、228 bp。因为测序时使用目的基因引物进行双向测序, 引物的结合区域有 20–50 bp 并不准确, 拼接时只拼接准确的位置, 故在头尾会有几个碱基的缺失, 但测

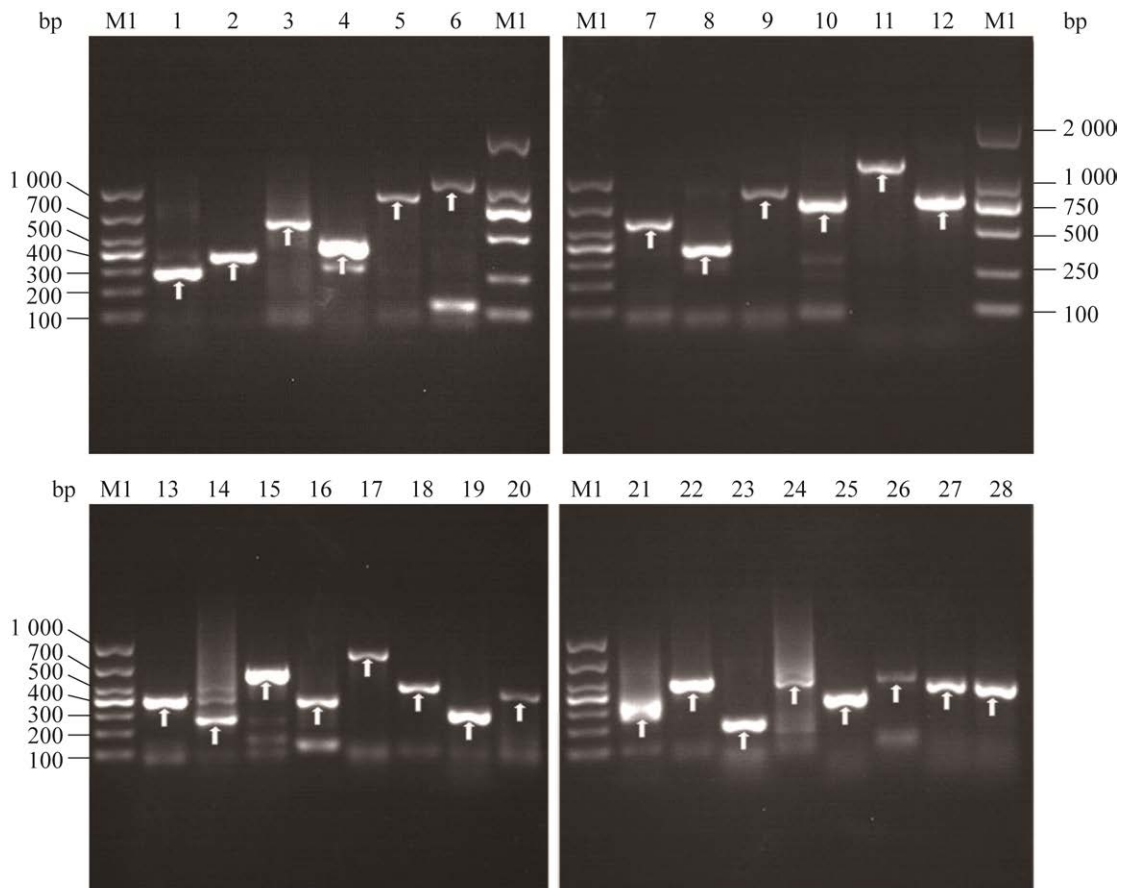


图1 14条 circRNAs PCR 鉴定

Figure 1 Identification of 14 circRNAs by PCR. M1 is DNA marker DL 1 000; M2 is DNA marker DL 2 000; In the figure, lanes 1–28 are respectively forward and reverse PCR results of circRNA 8-517, circRNA 38-801, circRNA 15-1452, circRNA 13-566, circRNA 185-1 702, circRNA 10-1507, circRNA 11-467, circRNA 8-731, circRNA 9-859, circRNA 11-474, circRNA 7-472, circRNA 4-475, circRNA 5-640, circRNA 5-402, i.e., 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 were their forward PCR results, and their reverse PCR results were respectively. Namely: circRNA 8-517 (forward 295 bp, reverse 353 bp); circRNA 38-801 (forward 605 bp, reverse 450 bp); circRNA 15-1 452 (forward 867 bp, reverse 1 080 bp); circRNA 13-566 (forward 554 bp, reverse 379 bp); circRNA 185-1 702 (forward 828 bp, reverse 737 bp); circRNA 10-1 507 (forward 1 179 bp, backward 752 bp); circRNA 11-467 (forward 389 bp, reverse 253 bp); circRNA 8-731 (forward 628 bp, reverse 361 bp); circRNA 9-859 (forward 809 bp, backward 462 bp); circRNA 11-474 (forward 276 bp, reverse 408 bp); circRNA 7-472 (forward 267 bp, reverse 472 bp); circRNA 4-475 (forward 206 bp, reverse 471 bp); circRNA 5-640 (forward 337 bp, reverse 455 bp); circRNA 5-402 (forward 402 bp, reverse 395 bp).

序序列与目的序列是完全一致的，尤其剪切位点处没有突变。可见目的 circRNA 成功构建到过表达载体上且其表达量也很高，为后续进行细胞水平功能验证实验提供前提基础。

2.2.2 circRNA 过表达重组质粒转染率检测

重组质粒转染后，收集细胞，提取 RNA，进行 qRT-PCR 检验 circRNA 过表达载体在肝癌细胞中表达其对应 circRNA 的情况，根据获取

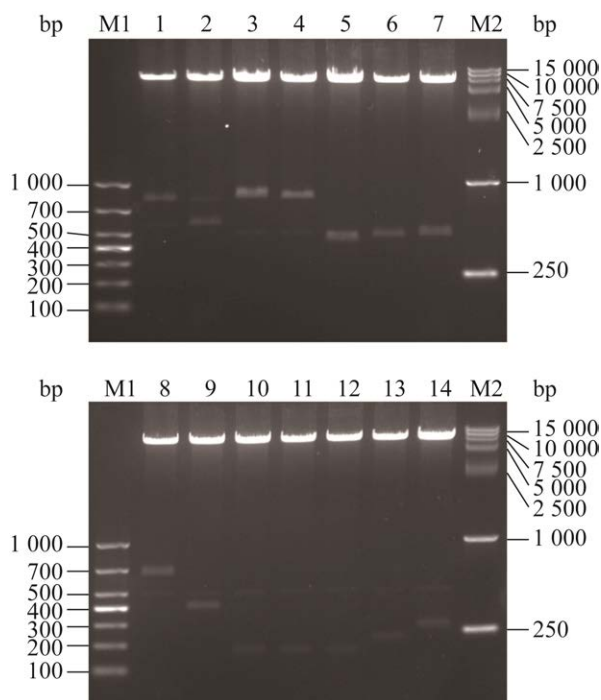


图2 14条 circRNAs 重组载体酶切鉴定

Figure 2 Identification of recombinant vectors for 14 circRNAs by enzyme digestion. M1 is DNA marker DL 1 000; M2 is DNA marker DL 15 000; In the figure, lanes 1–14 are circRNA 38-801, circRNA 13-566, circRNA 185-1 702, circRNA 9-859, circRNA 11-474, circRNA 7-472, and circRNA respectively recombinant vectors corresponding to circRNA 5-475, circRNA 5-640, circRNA 5-402, circRNA 328-177, circRNA 294-177, circRNA 50-170, circRNA 30-219 and circRNA 28-273; The target band sizes were 819 bp, 574 bp, 846 bp, 449 bp, 479 bp, 493 bp, 658 bp, 407 bp, 187 bp, 188 bp, 178 bp, 228 bp and 278 bp, respectively.

的 C_t 值结果作图如图 3 所示，图中可见 5 条目的 circRNAs 的过表达载体使得相应的 circRNA 在肝癌细胞中均能且过量表达，实验组 circRNA 表达水平都很高，过表达实验组中 circRNA 的表达量与空载质粒 (PLC) 组相比极显著上升，它们的表达量差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.0001$)，由此可知 circRNA 过表达载体使相应的 circRNA 在肝癌细胞中过量表达，基于此结果便可进行下一步功能验证实验。

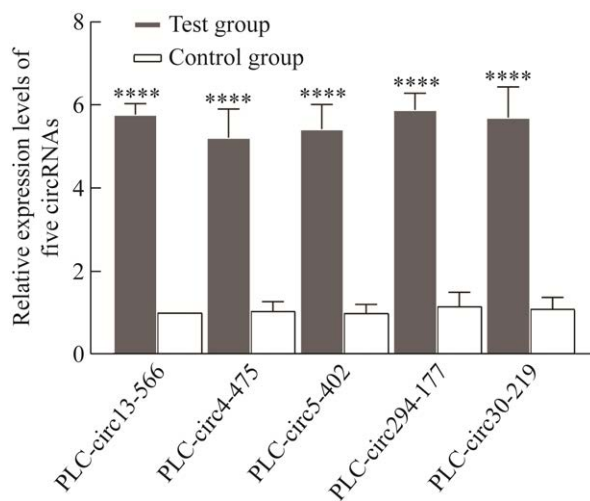


图3 目的 circRNAs 在过表达组和空载质粒组的表达情况

Figure 3 Expression of circRNAs in the overexpression group and empty plasmid group. **** indicates that the expression of circRNAs in the experimental overexpression group is particularly significant compared with the control group, $P < 0.0001$.

2.2.3 circRNA 过表达对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响

Zhang 等^[32]的互作实验发现，预测的 circRNA 38-1717 与 miRNA miR-143 以及 circRNA 6-1096 与 miRNA dre-let-7a，它们能直接相互靶定作用^[32]。这两个 miRNAs 同时也与条纹斑竹鲨肝脏内 GSTP1 相互靶定，并有研究发现过表达 GSTP1 影响肝癌细胞 HepG2 发生、发展^[33]，启示可通过探究 5 条过表达的 circRNAs 对肝癌细胞 HepG2 的增殖、迁移的影响，以此来研究条纹斑竹鲨肝脏内 circRNA 是否对 HepG2 的增殖、迁移有影响^[34]。同时也可通过将作用显著的 circRNAs 与已鉴定出来与条纹斑竹鲨肝脏内 GSTP1 相互靶定的 3 个 miRNAs 进行 microRNA sponge 预测，看能否相互靶定，以此来预测 circRNA 影响肝癌细胞 HepG2 的增殖、迁移的作用机制。

转染成功过表达 circRNA 的质粒后, 本研究通过进行 CCK-8 实验, 设置 5 个检测时间点, 加入 CCK-8 溶液后, 培养箱黑暗孵育 3 h 后检测 5 个时间点实验组和对照组在波长 450 nm 处的吸光值, 通过 5 个时间段的结果比较表达组和对照组对肝癌细胞增殖能力影响的大小, 结果如图 4 所示。图 4 表明: 过表达组与对照组相比, 对肝癌细胞增殖能力的抑制均比对

对照组增强, 实验组整体细胞增殖水平曲线都很平缓且有所减弱, 除 PLC-circ13-566 整体对肝癌细胞增殖的抑制不太显著外, 其余 4 条 circRNAs (PLC-circ5-402、PLC-circ4-475、PLC-circ294-177、PLC-circ30-219) 均能显著抑制肝癌细胞的增殖, 差异也具有统计学意义 ($P < 0.01$)。尤其是 PLC-circ4-475、PLC-circ294-177、PLC-circ30-219 的表达差异极为显著, PLC-circ4-475、

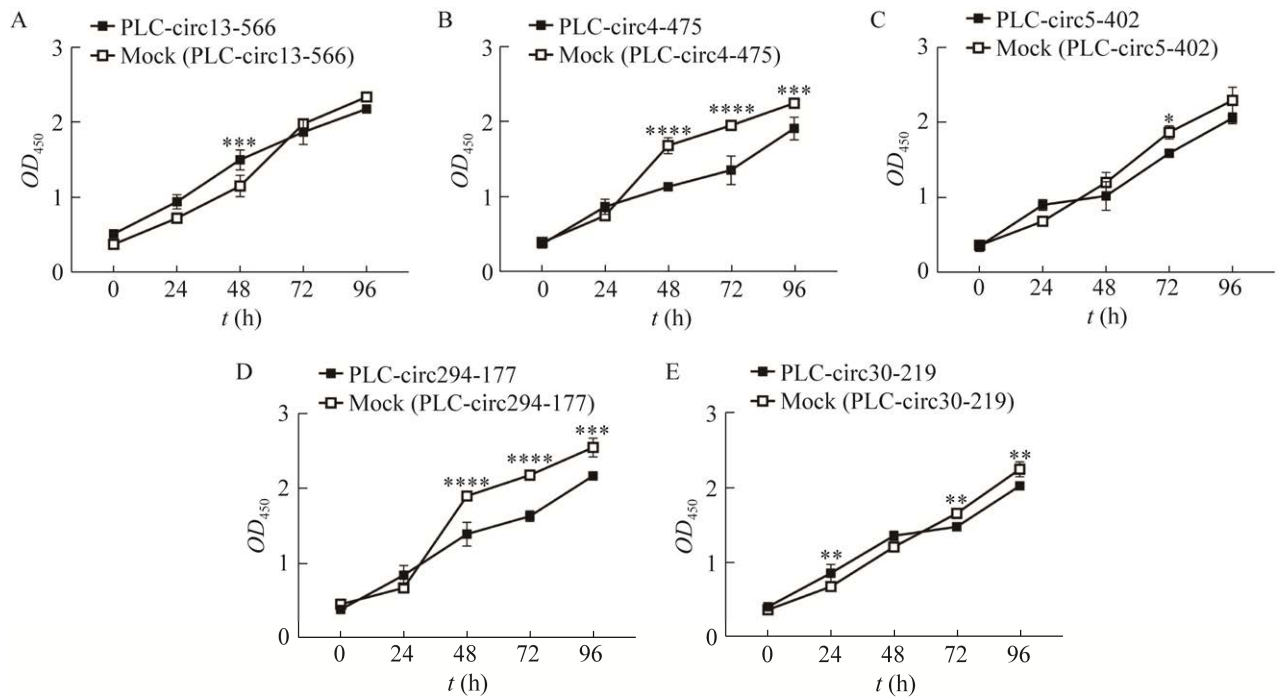


图 4 CCK8 检测过表达 circRNA 对肝癌细胞增殖能力的影响

Figure 4 Effect of circRNA overexpression on the proliferation of HepG2 cells detected by CCK8 assay. The five figure represent the absorbance values of the five circRNAs expression groups and their control groups at a wavelength of 450 nm in five time periods. (A) Represents circRNA 13-566, ***: $P < 0.001$, indicating that the experimental expression group has a more significant effect on the proliferation ability of liver cancer cells than the control group. (B) Represents circRNA 4-475, and ****: $P < 0.0001$, indicating that the experimental expression group has a particularly significant effect on the proliferation ability of liver cancer cells compared with the control group. (C) Represents circRNA 5-402, *: $P < 0.05$, indicating that the experimental expression group has a significant effect on the proliferation of hepatoma cells compared with the control group. (D) Represents circRNA 294-177, ****: $P < 0.0001$, indicating that the experimental expression group has a particularly significant effect on the proliferation of hepatoma cells compared with the control group. (E) Indicates circRNA 30-219, **: $P < 0.01$, indicating that the experimental expression group has a very significant effect on the proliferation ability of liver cancer cells compared with the control group.

PLC-circ294-177 在 48、72 和 96 h 实验组 OD 值显著高于对照组,可见过表达 circRNA 后细胞的增殖能力被强烈地抑制。

划痕实验,评价了 5 个 circRNA 实验组 PLC-circ13-566、PLC-circ5-402、PLC-circ4-475、PLC-circ294-177 和 PLC-circ30-219 对肝癌细胞迁移能力的影响,主要评价过表达相应 circRNA 后肝癌细胞划痕汇合度比率的大小,结果如图 5 所示。5 个实验组过表达 circRNA 后,每个实验组与其对照组相比,肝癌细胞划痕宽度变化并不大,汇合率也很低,可见细胞的迁移能力较对照组而言都相对减弱,其中 PLC-circ13-566、PLC-circ4-475、PLC-circ294-177 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$),差异都具有统计学意义。增殖和划痕实验均表明 5 条 circRNAs 在肝癌细胞 HepG2 中过量表达后,其增殖和迁移能力皆被强烈抑制。肝癌细胞的增殖能力和迁移能力与对照组相比,都有显著的、不同程度的下降,抑制了肝癌细胞增殖和迁移。PLC-circ4-475、PLC-circ294-177、PLC-circ30-219 这 3 条 circRNAs 显著降低肝癌细胞的增殖能力,而 PLC-circ13-566、PLC-circ4-475、PLC-circ294-177 这 3 条 circRNAs 对细胞迁移的抑制也很显著。可见 PLC-circ4-475、PLC-circ294-177 对应的 circRNAs 均能显著地抑制肝癌细胞的增殖和迁移能力。提示条纹斑竹鲨肝脏中的 circRNA 可能在肝癌的发生、发展过程中起着重要的调控作用,这些结果为后续进一步研究 circRNA 功能提供参考依据,也为揭示肝癌治疗机制提供新思路。

2.2.4 circRNA 的 microRNA sponge 预测

circRNA 最主要一个功能是与 mRNA 竞争结合 miRNA,来间接调节 mRNA 翻译或降解。通过预测 circRNA 上潜在结合的 miRNA,继而通过 miRNA 检索下游靶基因来获得 circRNA 可

能影响的 mRNA,来推测 circRNA 可能在哪些生物学过程中发挥作用来预测其功能。本研究利用网络在线工具 RNAhybrid 和 miRanda 软件,结果如图 6 所示,预测到对肝癌细胞作用显著的 circRNA 4-475、circRNA 294-177 中 circRNA 4-475 与两条 miRNAs ipu-miR-143 和 hsa-miR-143-3p_R+1_1ss21CA 都能相互靶定和结合。其中 circRNAs 和 miRNAs 的最小自由能均为 -19 kcal/mol ,表明 circRNA 4-475 与两个 miRNAs 结合的强度相同。这启示我们 circRNA 4-475 对肝癌细胞的抑制作用可能是通过发挥其海绵作用结合 miRNA 来调控 mRNA,进而调节肝癌细胞的增殖和迁移。而我们的另一个作用显著的 circRNA 294-177 可能通过其他调控机制或生物学过程来调节肝癌细胞的增殖和迁移,可见鲨鱼肝脏里的 circRNAs 对肝癌细胞增殖、迁移的影响作用机制和途径是多种多样的,也有待我们后续去进行探索和发现。

3 讨论

已有研究表明 circRNA 具有的结构特殊性、生物学性质稳定性等特点使其具有作为生物标志物的巨大潜力,且针对它们的作用机制及靶向治疗位点方面的研究仍在不断深入^[18,35],但是对于条纹斑竹鲨肝脏内 circRNAs 及其在肝癌作用的 circRNA 却鲜有报道^[36]。

本研究着眼于预测条纹斑竹鲨肝脏中潜在的 circRNA,进行了实验筛选、验证其真实性,并通过细胞水平功能实验探究其在肝再生和肝癌发生、发展过程中潜在的生物学功能和作用机制。研究首先对条纹斑竹鲨肝脏的 circRNA 进行了高通量测序,预测出了很多潜在的 circRNA,验证实验确认了 14 条 circRNAs 的真实性;其次通过构建过表达载体对其功能进行

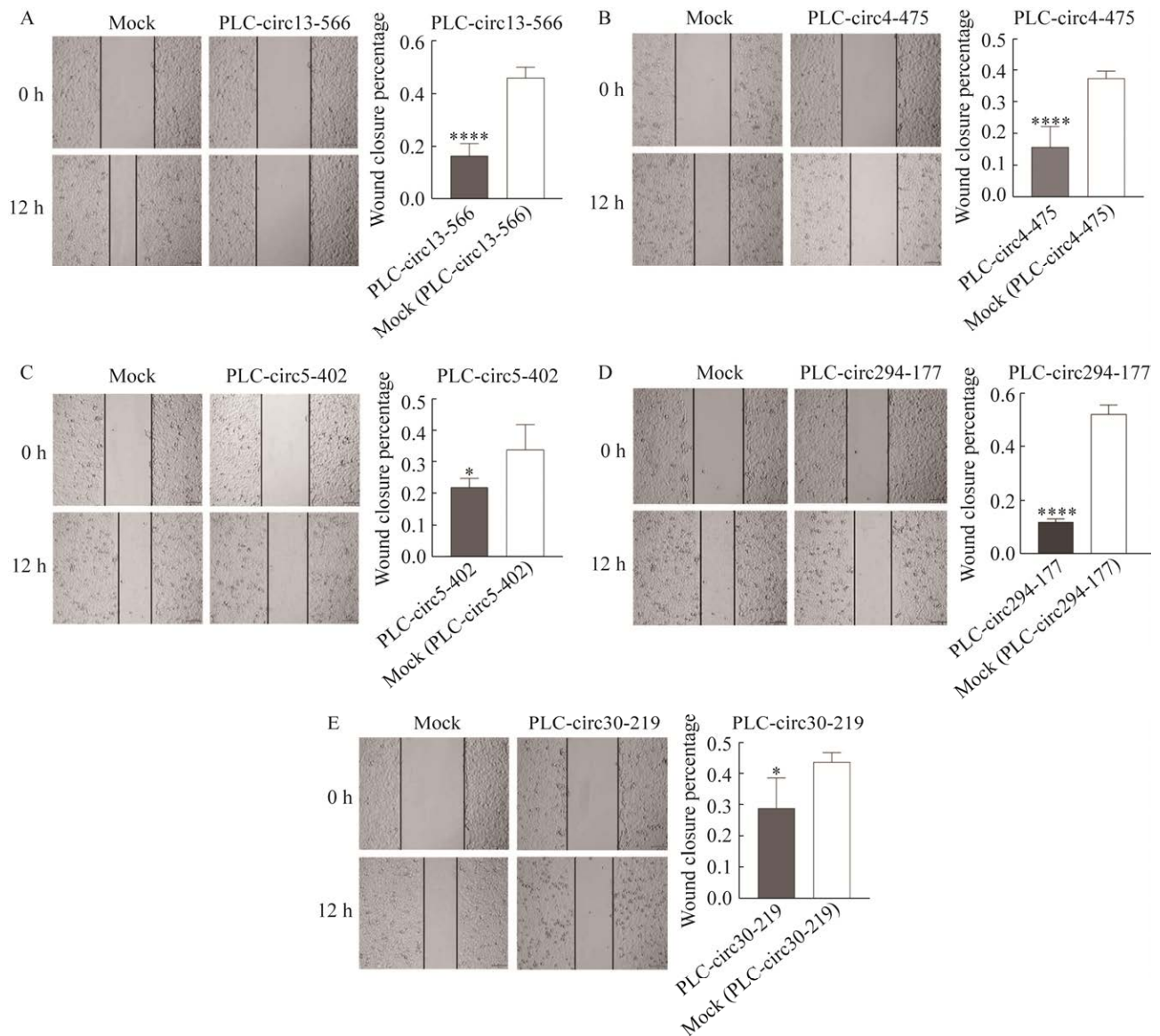


图5 划痕实验检测 circRNA 过表达对肝癌细胞迁移力的影响

Figure 5 Effect of circRNA overexpression on the migration of HepG2 cells detected by scratch assay. The five figures represent the changes of scratch width between the experimental group and the control group of five circRNAs at 0 h and 12 h of scratching. (A) represents circRNA 13-566, **** represents $P < 0.0001$, indicating that the experimental expression group has a particularly significant effect on the migration ability of liver cancer cells compared with the control group. (B) represents circRNA 4-475, **** represents $P < 0.0001$, indicating that the experimental expression group has a particularly significant effect on the migration ability of hepatoma cells compared with the control group. (C) indicates circRNA 5-402, * indicates $P < 0.05$, indicating that the experimental expression group has a significant effect on the migration ability of liver cancer cells compared with the control group. (D) represents circRNA 294-177, **** represents $P < 0.0001$, indicating that the experimental expression group has a particularly significant effect on the migration ability of hepatoma cells compared with the control group. (E) indicates circRNA 30-219, * indicates $P < 0.05$, indicating that the experimental expression group has a significant effect on the migration ability of liver cancer cells compared with the control group.

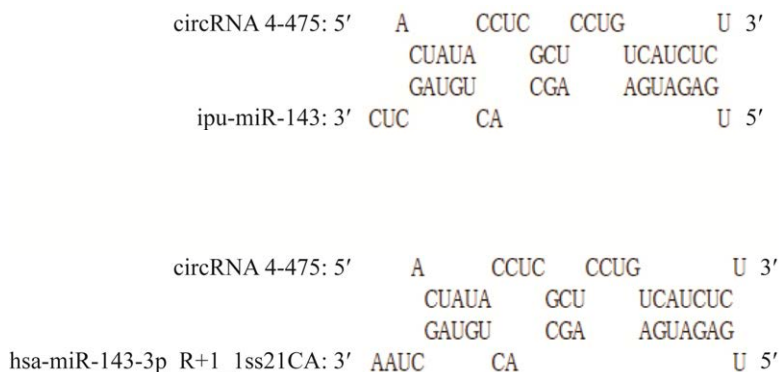


图 6 circRNA 和 miRNA 相互靶定预测图

Figure 6 Prediction of binding between circRNA and miRNA.

探究,发现 circRNA 对肝癌细胞增殖和迁移能力能显著地抑制,而其中对作用显著的 circRNA 进行 microRNA sponge 预测结果启示有些 circRNA 发挥作用可能是通过竞争性结合 miRNA 这一作用机制。研究丰富了 circRNA 的生物物种,结果可能有助于扩宽现有关于软骨鱼类 circRNA 的研究范畴,并为表征海洋动物 circRNA 的功能提供基础,更为 circRNA 在肝癌治疗中的作用机制提供新思路。

目前 circRNA 在肝脏疾病方面的研究还处在起步的阶段,以及许多 circRNA 在肝癌发生、发展过程中的功能机制和临床意义还未可知,各类肝脏疾病中的 circRNA 研究鲜有报道。本研究初步探索了 circRNA 对肝癌细胞增殖、迁移的影响,但对其具体作用机制和种类及两条作用显著的 circRNAs 与 miRNAs 是否能相互作用还有待深入探索和验证。

本研究为我们下一步深入研究 circRNA 其他功能及其作用机制奠定坚实基础,也为以后肝癌的精准治疗提供新的思路和理论基础。今后我们可以通过研究发现更多在抑制肝癌增殖、迁移中发挥作用的 circRNA,为肝癌的早发现、早诊断、早治疗提供帮助。如通过筛选并实验验证可能与本研究验证的 5 条 circRNAs

互作的 miRNAs 之间的靶向性,探讨 circRNAs 靶向 miRNA 在调控肝癌发生、发展中的分子机制,为作为肝癌治疗潜在的靶点提供参考^[35-37]。还可分别移植过表达 circRNA 和空载的肝癌细胞,进行裸鼠皮下成瘤的实验来验证本研究发现的 circRNAs 在体内对肝癌细胞增殖的影响等许多方式来验证研究的 circRNA 能否抑制肝癌细胞增殖和迁移。

REFERENCES

- [1] Ma Y, Liu YX, Jiang ZS. CircRNAs: a new perspective of biomarkers in the nervous system. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110251.
- [2] Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA-new member of noncoding RNA with novel functions. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(11): 1136-1141.
- [3] Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155-160.
- [4] Matsumoto Y, Fishel R, Wickner RB. Circular single-stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 1990, 87(19): 7628-7632.
- [5] Danan MR, Schwartz S, Edelheit S, et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in archaea. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 3131-3142.
- [6] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870-885.

- [7] Shen YD, Guo XW, Wang WM. Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish. *FEBS Lett*, 2017, 591(1): 213-220.
- [8] Werfel S, Nothjunge S, Schwarzmayr T, et al. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 98: 103-107.
- [9] Ma S, Kong S, Wang F, et al. CircRNAs: biogenesis, functions, and role in drug-resistant tumours. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 119.
- [10] Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, et al. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature*, 1986, 323(6088): 558-560.
- [11] Abe N, Matsumoto K, Nishihara M, et al. Rolling circle translation of circular RNA in living human cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 16435.
- [12] 王琮, 赵健, 宋晓峰. 真核生物环形 RNA 编码蛋白的研究进展. *生物信息学*, 2020, 18(1): 1-7.
Wang C, Zhao J, Song XF. Review on circular RNA with protein-coding ability in eukaryotes. *Chin J Bioinform*, 2020, 18(1): 1-7 (in Chinese).
- [13] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [14] Ng WL, Marinov GK, Liau ES, et al. Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway. *RNA Biol*, 2016, 13(9): 861-871.
- [15] Xia WJ, Qiu MT, Chen R, et al. Circular RNA has_circ_0067934 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and promoted proliferation. *Sci Rep*, 2016, 6: 35576.
- [16] Chen L, Zhang S, Wu J, et al. circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family. *Oncogene*, 2017, 36(32): 4551-4561.
- [17] 黄亮, 王绪宁, 郑伟. 环形 RNA 在肿瘤中的研究现状. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(44): 35-36, 38.
Huang L, Wang XN, Zheng W. Research advances of circular RNA in tumor. *World Latest Med Inf*, 2017, 17(44): 35-36, 38 (in Chinese).
- [18] 谢依, 李田文, 莫小燕, 等. 环状 RNA 的生物学功能及其在肿瘤发生中的作用. *生物工程学报*, 2016, 32(11): 1507-1518.
Xie Y, Li TW, Mo XY, et al. Circular RNAs and their roles in tumorigenesis. *Chin J Biotech*, 2016, 32(11): 1507-1518 (in Chinese).
- [19] Yao ZC, Luo JY, Hu KP, et al. ZKSCAN₁ gene and its related circular RNA (circZKSCAN₁) both inhibit hepatocellular carcinoma cell growth, migration, and invasion but through different signaling pathways. *Mol Oncol*, 2017, 11(4): 422-437.
- [20] Lu CE, Zhang J, Nie ZM, et al. Study of microRNAs related to the liver regeneration of the whitespotted bamboo shark, *Chiloscyllium plagiosum*. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 795676.
- [21] Zhang J, Liu YL, Zhang XF, et al. The identification of microRNAs in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*) liver by Illumina sequencing. *Gene*, 2013, 527(1): 259-265.
- [22] Zhang LL, Hou CF, Chen C, et al. The role of N₆-methyladenosine (m⁶A) modification in the regulation of circRNAs. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 105.
- [23] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [24] Cheng DD, Chen YN, Lu CE, et al. Preliminary profiling of microRNA in the normal and regenerating liver of *Chiloscyllium plagiosum*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2017, 24: 60-67.
- [25] Jyothi MN, Rai DV, Nagesh Babu R. Identification and characterization of high temperature stress responsive novel miRNAs in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(3): 835-849.
- [26] Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 1998, 392(6679): 917-920.
- [27] MacFarlane LA, Murphy PR. microRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*, 2010, 11(7): 537-561.
- [28] Yang LR, Ge YH, Cheng DD, et al. Detection of piRNAs in whitespotted bamboo shark liver. *Gene*, 2016, 590(1): 51-56.
- [29] Zhai RR, Ye SH, Zhu GF, et al. Identification and integrated analysis of glyphosate stress-responsive microRNAs, lncRNAs, and mRNAs in rice using genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 238.
- [30] 刘楚霄, 李响, 南芳, 等. 环形 RNA 在天然免疫过程中的重要功能. *生命的化学*, 2019, 39(3): 424-429.
Liu CX, Li X, Nan F, et al. Circular RNAs in innate immunity. *Chem Life*, 2019, 39(3): 424-429 (in Chinese).
- [31] Ge YH, Zhang JW, Shi XY, et al. Differential expression and miRNA regulation of the *GSTP1* gene in the regenerating liver of *Chiloscyllium plagiosum*. *Fish Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 791-802.
- [32] Zhang WJ, Qin P, Gong XX, et al. Identification of circRNAs in the liver of whitespotted bamboo shark

- (*Chiloscyllium plagiosum*). *Front Genet*, 2020, 11: 596308.
- [33] 刘润田, 安聪静, 白云, 等. *GSTP1* 基因对人肝癌细胞系 HepG2 增殖和侵袭能力的影响. *肿瘤防治研究*, 2016, 43(12): 1039-1042.
- Liu RT, An CJ, Bai Y, et al. Effects of *GSTP1* on proliferation and invasion of human HepG2 cells. *Cancer Res Prev Treat*, 2016, 43(12): 1039-1042 (in Chinese).
- [34] 廖艳, 陈谱, 廖维甲. 环形 RNA 在原发性肝细胞癌中的研究现状及展望. *中国实验诊断学*, 2019, 23(1): 175-178.
- Liao Y, Chen P, Liao WJ. Research status and prospect of circrnas in primary hepatocellular carcinoma. *Chin J Lab Diagn*, 2019, 23(1): 175-178 (in Chinese).
- [35] 李标. 环状 RNA circMARS 和 circITPR1 在抗结核药物性肝损伤中的诊断价值及作用机制研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2019.
- Li B. The diagnostic value and mechanism of circular RNA circMARS and circITPR1 in anti-tuberculosis drug-induced liver injury[D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [36] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res*, 2013, 73(18): 5609-5612.
- [37] Deng R, Cui XH, Dong YX, et al. Construction of circRNA-based *CeRNA* network to reveal the role of circRNAs in the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Front Genet*, 2021, 12: 626764.

(本文责编 陈宏宇)