

circ_0000144 靶向 miR-502-5p 调控人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖和凋亡及迁移侵袭

储明慧, 陈海银, 张晓力

引用: 储明慧, 陈海银, 张晓力. circ_0000144 靶向 miR-502-5p 调控人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖和凋亡及迁移侵袭. 国际眼科杂志 2021;21(10):1686-1692

作者单位: (226600) 中国江苏省海安市中医院眼耳鼻喉科
作者简介: 储明慧, 毕业于南通医学院, 本科, 中级职称, 主治医师, 研究方向: 眼科。

通讯作者: 陈海银, 毕业于南通大学, 本科, 中级职称, 主治医师, 研究方向: 眼科. 747213368@qq.com

收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-09-06

摘要

目的: 探讨环状 RNA (circRNA) circ_0000144 是否靶向微小 RNA (miRNA)-502-5p 调控人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移侵袭。

方法: 将 Y79 细胞分为 si-NC 组 (转染 si-NC)、si-circ_0000144 组 (转染 si-circ_0000144)、miR-NC 组 (转染 miR-NC)、miR-502-5p 组 (转染 miR-502-5p mimic)、pcDNA 组 (转染 pcDNA)、pcDNA-circ_0000144 组 (转染 pcDNA-circ_0000144)、si-circ_0000144+anti-miR-NC 组 (转染 si-circ_0000144+anti-miR-NC)、si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组 (转染 si-circ_0000144+anti-miR-502-5p)。实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测视网膜母细胞瘤组织和细胞中 circ_0000144 和 miR-502-5p 表达, 溴化噻唑蓝四氮唑 (MTT) 检测细胞增殖, 免疫印迹实验 (western blot) 测定细胞核相关抗原 Ki-67 (Ki-67)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 蛋白表达, 流式细胞术分析细胞凋亡, Transwell 测定细胞迁移、侵袭。生物信息学预测与双荧光素酶报告实验分析 circ_0000144 是否靶向 miR-502-5p。

结果: 31 例视网膜母细胞瘤组织中 circ_0000144 表达量比瘤旁组织高, miR-502-5p 表达量比瘤旁组织低 ($P < 0.05$)。与 si-NC 组比较, si-circ_0000144 组 Y79 细胞中 circ_0000144 表达量、OD 值、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量、迁移、侵袭细胞数减少, Bax 蛋白表达量、凋亡率增加 ($P < 0.05$)。circ_0000144 靶向负调控 miR-502-5p 的表达。miR-502-5p 组较 miR-NC 组增加 Y79 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达量, 减少 OD 值、迁移及侵袭细胞数、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量 ($P < 0.05$)。与 si-circ_0000144+anti-miR-NC 组比较, si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组 Y79 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达量降低, OD 值、迁移及侵袭细胞数、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量升高。

结论: 视网膜母细胞瘤组织中 circ_0000144 高表达, 通过负调控 miR-502-5p 抑制其表达降低视网膜母细胞瘤

Y79 细胞增殖、迁移侵袭, 促进凋亡。

关键词: 视网膜母细胞瘤; circ_0000144; miR-502-5p; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.10.04

circ_0000144 targeting miR-502-5p to regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human retinoblastoma Y79 cells

Ming-Hui Chu, Hai-Yin Chen, Xiao-Li Zhang

Department of Ophthalmology and Otolaryngology, Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hai'an 226600, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hai-Yin Chen. Department of Ophthalmology and Otolaryngology, Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hai'an 226600, Jiangsu Province, China. 747213368@qq.com

Received: 2020-12-22 Accepted: 2021-09-06

Abstract

• **AIM:** To investigate whether circular RNA (circRNA) circ_0000144 targets microRNA (miRNA) - 502 - 5p to regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human retinoblastoma Y79 cells.

• **METHODS:** Y79 cells were divided into si-NC group (transfected with si-NC), si-circ_0000144 group (transfected with si-circ_0000144), miR-NC group (transfected with miR-NC), miR-502-5p group (transfected with miR-502-5p mimic), pcDNA group (transfected with pcDNA), pcDNA-circ_0000144 group (transfected with pcDNA-circ_0000144), si-circ_0000144+anti-miR-NC group (transfected with si-circ_0000144+anti-miR-NC), si-circ_0000144+anti-miR-502-5p group (transfected with si-circ_0000144+anti-miR-502-5p). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of circ_0000144 and miR-502-5p in retinoblastoma tissues and cells, thiazole blue tetrazolium bromide (MTT) detected cell proliferation, and western blot was employed to determine the expression of nuclear associated antigen Ki67 (Ki-67), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 protein. Flow cytometry detected cell apoptosis, and Transwell measured cell migration and invasion. Bioinformatics prediction and dual luciferase

report experiment analyzed whether circ_0000144 targets miR-502-5p.

• **RESULTS:** The expression of circ_0000144 in 31 cases of retinoblastoma tissue was higher than that of adjacent tissues, and the expression of miR-502-5p was lower than that of adjacent tissues ($P < 0.05$). Compared with the si-NC group, the circ_0000144 expression, OD value, expression of Ki-67, Bcl-2, MMP-2, MMP-9 protein, number of migration and invasion cells of the Y79 cells in the si-circ_0000144 group decreased, and the expression of Bax protein and apoptosis rate increased ($P < 0.05$). circ_0000144 targets and negatively regulates the expression of miR-502-5p. Compared with miR-NC group, miR-502-5p group increased cell apoptosis rate and expression of Bax protein of the Y79 cells, while decreased OD value, number of migration and invasion cells, and the expression of Ki-67, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 protein ($P < 0.05$). Compared with the si-circ_0000144+anti-miR-NC group, cell apoptosis rate and Bax protein expression of the Y79 cells in the si-circ_0000144+anti-miR-502-5p group decreased, but the OD value, number of migration and invasion cells, the protein expression of Ki-67, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 increased.

• **CONCLUSION:** circ_0000144 was highly expressed in retinoblastoma tissue, and inhibiting circ_0000144 can reduce the proliferation, migration and invasion of retinoblastoma Y79 cells, and promote apoptosis through negative regulation of miR-502-5p.

• **KEYWORDS:** retinoblastoma; circ_0000144; miR-502-5p; proliferation; apoptosis; migration; invasion

Citation: Chu MH, Chen HY, Zhang XL. circ_0000144 targeting miR-502-5p to regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human retinoblastoma Y79 cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(10):1686-1692

0 引言

视网膜母细胞瘤是一种眼内恶性肿瘤,最常影响5岁以下的婴儿^[1]。临床上视网膜母细胞瘤患者的典型特征是白瞳和斜视,活产儿发病率约为1/20000^[2]。尽管在过去的几十年中进行了广泛的研究,但视网膜母细胞瘤仍然难以诊断和治愈,在发展中国家,相关的死亡率高达约70%^[3]。因此,阐明发病机制的分子机制对于视网膜母细胞瘤的早期发现和靶向治疗十分重要。环状RNA(circular RNA, circRNA)是单链,共价闭合的RNA分子,在多种类型的癌症(包括结直肠癌,肝细胞癌和胰腺癌)中表现出异常表达,可能成为各种癌症类型的诊断或治疗靶标^[4-5]。属于一类短非编码RNA(19~22个核苷酸)的微小RNA(MicroRNA, miRNA)通过靶向影响细胞生理和疾病发展的多种分子来调控基因表达水平,在人类疾病中发挥重要作用^[6]。研究表明, circ_0000144在胃癌组织和细胞中上调表达,敲低其表达可减缓胃癌细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭,加速细胞凋亡^[7]。 circ_0000144在膀胱癌组织中表达上调,下调其表达可抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭^[8]。 miR-502-5p在肾细胞癌组织中低表达,上调其表达可抑制肾细胞癌细胞的迁移和侵袭, circ_

001842通过miR-502-5p参与肾细胞癌发病机制^[9]。 miR-502-5p在乳腺癌组织和细胞中下调表达,可抑制乳腺癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[10]。但是,目前尚未探讨 circ_0000144和miR-502-5p在视网膜母细胞瘤组织中的表达概况,以及其在视网膜母细胞瘤Y79细胞中的生物学功能和机制。基于此,本研究旨在确定 circ_0000144和miR-502-5p在视网膜母细胞瘤Y79细胞增殖、凋亡、迁移侵袭中所起的作用,以增进对视网膜母细胞瘤发病机制的理解。

1 材料和方法

1.1 材料 2015-07/2017-04本研究共纳入31对视网膜母细胞瘤组织和配对的瘤旁组织(离肿瘤组织约1~2cm),视网膜母细胞瘤患者(男22例,女9例)来自江苏省海安市中医院,术前未接受其他治疗,并获得其知情同意。该研究得到江苏省海安市中医院伦理委员会的批准。在手术期间,收集所有患者的视网膜母细胞瘤组织和瘤旁正常组织,保持在液氮中以用于后续分析。

人视网膜母细胞瘤细胞株Y79购自中国科学院细胞资源中心(上海), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)购自美国Invitrogen, si-circ_0000144、si-NC、pcDNA、pcDNA-circ_0000144、miR-502-5p mimic、miR-502-5p inhibitor(anti-miR-502-5p)、mimic阴性对照miR-NC、inhibitor阴性对照anti-miR-NC购自上海GenePharma, M-MLV逆转录酶购自日本TaKaRa, SYBR Green assay试剂盒购自德国Roche, 溴化噻唑蓝四氮唑(thiazole blue tetrazolium bromide, MTT)购自美国Life Technologies, 膜联蛋白V(Annexin V)-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自美国Becton Dickinson, RIPA缓冲液、二抗购自美国Cell Signaling Technology, 二辛可宁酸蛋白质测定试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific, ECL工作液购自南京Biochannel, 荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国BioVision, 兔单克隆细胞核相关抗原Ki-67(nuclear associated antigen Ki67, Ki-67)抗体、兔单克隆B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)抗体、兔单克隆Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated x protein, Bax)抗体、兔单克隆基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)-2抗体、兔单克隆MMP-9抗体、兔单克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购自美国Abcam公司。 Multiscan MK3酶标仪购自美国Thermo Scientific, 7500 PCR仪购自美国ABI, FACSCalbur流式细胞仪购自美国BD。

1.2 方法

1.2.1 实时定量聚合酶链反应检测 circ_0000144和miR-502-5p表达 按照制造商的说明,用TRIzol提取视网膜母细胞瘤组织和瘤旁组织的总RNA,使用M-MLV逆转录酶将其合成为互补DNA(complementary DNA, cDNA)。使用SYBR Green试剂盒进行实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。 circ_0000144和miR-502-5p, GAPDH(用于circRNA归一化)和U6(用于miRNA归一化)的引物如下: circ_0000144有义: 5'-GAGTGTGGCCTGTCTCAA-3'和反义 5'-TTGTGCCAGTTGCCTGTAT-3'; GAPDH有义:

5' - ACACCCACTCCTCCACCTTT - 3' 和反义: 5' - TTACTCCTTGGAGGCCATGT - 3'; miR - 502 - 5p: 5' - ATCCTTGCTATCTGGGTGCTA - 3' 和通用引物 5' - CGAATTCTAGAGCTCGAGGCAGGCCACATGGCTGGCTAGT TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCC (T) - 3'; U6 有义: 5' - CTCGCTTCGGCAGCACA - 3' 和反义 5' - AACGCTTACGAATTTGCGT - 3'。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法评估 circ_0000144 和 miR-502-5p 相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct(\text{靶标}) - Ct(\text{GAPDH/U6})$ 。

1.2.2 细胞培养与分组处理 Y79 细胞在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中和 37°C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。将对数期 Y79 细胞分为 si-NC 组(转染 si-NC)、si-circ_0000144 组(转染 si-circ_0000144)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-502-5p 组(转染 miR-502-5p mimic)、pcDNA 组(转染 pcDNA)、pcDNA-circ_0000144 组(转染 pcDNA-circ_0000144)、si-circ_0000144+anti-miR-NC 组(转染 si-circ_0000144 和 anti-miR-NC)、si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组(转染 si-circ_0000144 和 anti-miR-502-5p)。将 Y79 细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度接种在 6 孔板中,汇合至 60% 时,利用 Lipofectamine 2000 试剂进行上述转染。48h 后,根据 1.2.1 中的 qRT-PCR 检测步骤,测定 circ_0000144 和 miR-502-5p 表达,并进行后续检测。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 将转染 48h 后的 Y79 细胞接种到 96 孔板中,然后将细胞培养 2d 时,分别与 100 μ L 无菌 MTT 染料(0.5mg/mL)和 150 μ L 二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)孵育,15min 后,于 Multiscan MK3 酶标仪测量 490nm 处的吸光度 OD 值。

1.2.4 免疫印迹实验测定蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液裂解转染的 Y79 细胞,并根据制造商的说明使用二辛可宁酸蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。然后将 20 μ g 蛋白质上样到 10% 凝胶上,使用 SDS-PAGE 分离并转膜。然后在室温下将膜用 5% 无脂牛奶封闭 2h。随后,将膜与 Ki-67、Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9(均为 1:1000)和 GAPDH(参照,1:2500)的一抗一起孵育,在 4°C 过夜,与抗辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:2000)室温下孵育 2h。通过 ECL 工作液观察免疫反应带。

1.2.5 流式细胞术分析细胞凋亡 将转染 48h 后的 Y79 细胞用磷酸盐缓冲液洗涤,重悬于 500 μ L 结合缓冲液中,在黑暗中添加 5 μ L FITC 和 5 μ L 碘化丙啶,并孵育 15min。之后,通过 FACSCalbur 流式细胞仪测量 Y79 细胞凋亡。

1.2.6 Transwell 测定细胞迁移和侵袭 分别使用 24 孔 8 μ m 的 Transwell 和 Matrigel 包被的 Transwell 进行迁移和侵袭分析。将约 100 μ L Y79 细胞溶液(包含 5×10^5 个细胞)铺板到 Transwell 插入物的顶部腔室中,然后将 600 μ L 10% FBS 培养基添加到下部腔室中。24h 后,将迁移或侵袭的细胞用 70% 乙醇固定,用 1% 结晶紫染色,并在光学显微镜(200 \times 放大倍数)下在 5 个视野中计数细胞数。

1.2.7 生物信息学预测与双荧光素酶报告实验 Circular RNA Interactome 软件预测 circ_0000144 与 miR-502-5p 存在互补配对的核苷酸序列。将 circ_0000144 和 miR-502-5p 的预测结合位点片段和突变片段分别插入各自的荧光素酶载体,即报告载体野生型(WT)-circ_0000144 和

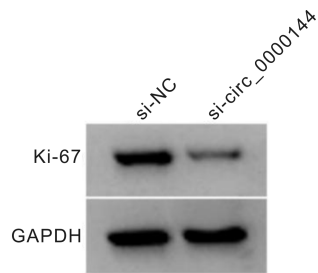


图 1 Ki-67 蛋白表达。

表 1 circ_0000144 和 miR-502-5p 在视网膜母细胞瘤组织中的表达 ($n=31, \bar{x} \pm s$)

分组	circ_0000144	miR-502-5p
瘤旁组织	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04
视网膜母细胞瘤组织	3.67 \pm 0.25 ^a	0.33 \pm 0.03 ^a
<i>t</i>	59.040	74.608
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:^a $P < 0.01$ vs 瘤旁组织。

表 2 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖的影响 ($n=31, \bar{x} \pm s$)

分组	circ_0000144	OD 值(490nm)	Ki-67 蛋白
si-NC 组	1.00 \pm 0.06	0.91 \pm 0.06	0.64 \pm 0.04
si-circ_0000144 组	0.29 \pm 0.03 ^a	0.44 \pm 0.04 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a
<i>t</i>	31.752	18.553	27.504
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a $P < 0.01$ vs si-NC 组。

突变型(MUT)-circ_0000144。为了确定二者的结合,将 miR-NC、miR-502-5p mimic 与 WT-circ_0000144、MUT-circ_0000144 一起转染到 Y79 细胞中,48h 后收集细胞并裂解,根据试剂盒说明书使用荧光素酶报告基因检测试剂盒和分析系统进行测定。

统计学分析:数据采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过独立样本 *t* 检验进行两组间差异比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0000144 和 miR-502-5p 在视网膜母细胞瘤组织中的表达 31 例视网膜母细胞瘤组织中 circ_0000144 表达量高于瘤旁组织,miR-502-5p 表达量低于瘤旁组织,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

2.2 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖的影响 如表 2、图 1 所示,si-circ_0000144 组较 si-NC 组 Y79 细胞中 circ_0000144 表达量减少,OD 值、Ki-67 蛋白表达量降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡的影响 如表 3、图 2 所示,si-circ_0000144 组 Y79 细胞凋亡率高于 si-NC 组,Bcl-2 蛋白表达量低于 si-NC 组,Bax 蛋白表达量高于 si-NC 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞迁移和侵袭的影响 如表 4、图 3 所示,si-circ_0000144 组 Y79 细胞的迁移、侵袭细胞数比 si-NC 组少,并且 MMP-2、MMP-9 蛋白表达量比 si-NC 组低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

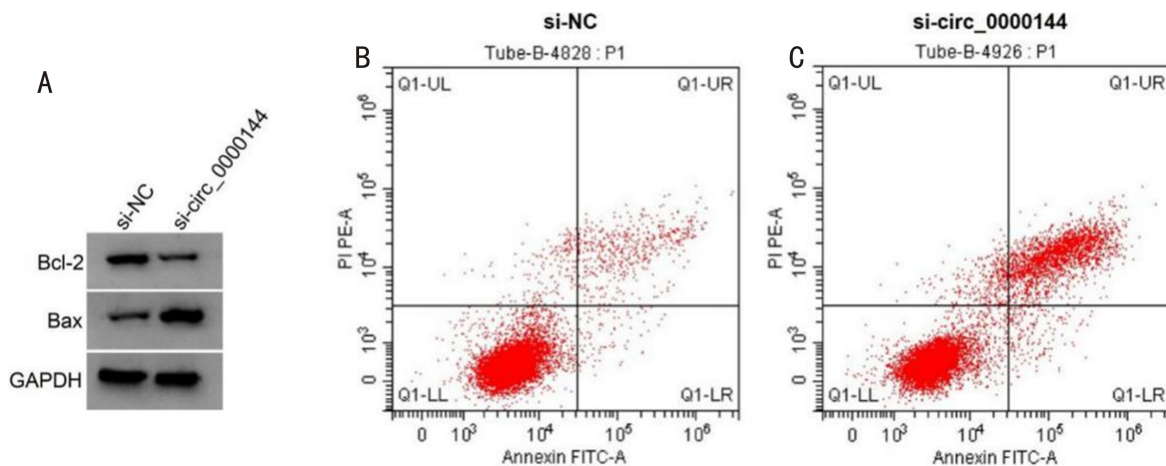


图2 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡的影响 A: 凋亡相关蛋白表达; B: 细胞凋亡流式图。

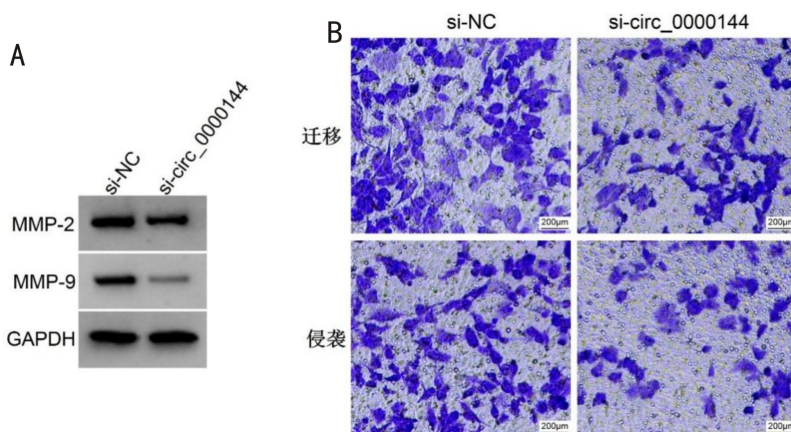


图3 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞迁移和侵袭的影响 A: 迁移侵袭相关蛋白表达; B: 视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的迁移、侵袭(结晶紫染色)。

表3 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡的影响 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	凋亡率 (%)	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白
si-NC	5.58±0.45	0.52±0.03	0.29±0.02
si-circ_0000144	22.78±2.10 ^a	0.12±0.02 ^a	0.76±0.04 ^a
t	24.026	33.282	31.529
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:^aP<0.01 vs si-NC 组。

表4 抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞迁移和侵袭的影响 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
si-NC 组	127.60±10.61	98.68±7.37	0.85±0.04	0.72±0.05
si-circ_0000144 组	57.71±5.61 ^a	42.58±3.28 ^a	0.35±0.03 ^a	0.28±0.02 ^a
t	17.470	20.863	30.000	24.512
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^aP<0.01 vs si-NC 组。

WT-circ_0000144 5' aaaagagagaaaaguCAAGGAac 3'
miR-502-5p 3' aucgugggucuaucGUUCCUa 5'

MUT-circ_0000144 5' aaaagagagaaaaguAGCUACac 3'

图4 circ_0000144 的序列中含有与 miR-502-5p 互补的核苷酸序列。

2.5 circ_0000144 靶向调控 miR-502-5p 的表达

Circular RNA Interactome 软件预测出 circ_0000144 与 miR-502-5p 的靶向结合位点(图4)。miR-502-5p 组

WT-circ_0000144 荧光活性低于 miR-NC 组,差异有统计学意义(P<0.01),miR-502-5p 组 MUT-circ_0000144 荧光活性与 miR-NC 组差异无统计学意义(P>0.05,表5)。pcDNA-circ_0000144 组(0.39±0.03)比 pcDNA 组(1.00±0.08)减少 miR-502-5p 表达量,si-circ_0000144 组(3.01±0.22)比 si-NC 组(1.02±0.06)增加 miR-502-5p 表达量,差异均有统计学意义(P<0.05)。

2.6 miR-502-5p 过表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

如表6、7,图5、6所示,

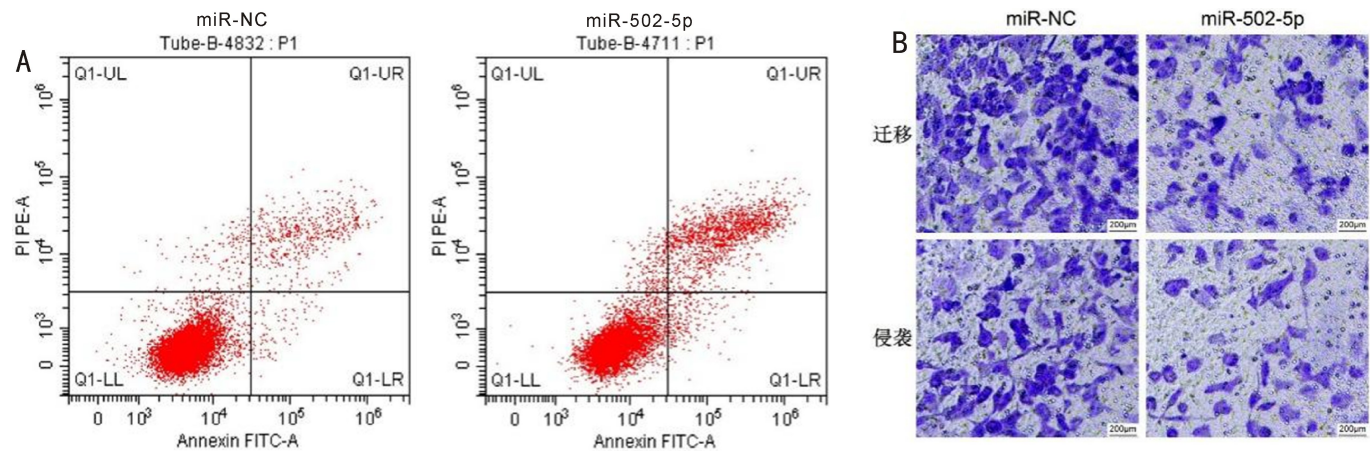


图5 miR-502-5p过表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡、迁移和侵袭的影响 A: 细胞凋亡流式图; B: 视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的迁移和侵袭(结晶紫染色)。

表5 双荧光素酶报告实验

分组	WT-circ_0000144	MUT-circ_0000144
miR-NC 组	1.02±0.07	1.03±0.08
miR-502-5p 组	0.51±0.04 ^a	1.00±0.05
<i>t</i>	18.977	0.954
<i>P</i>	<0.01	0.354

注:^a*P*<0.01 vs miR-NC 组。

表6 miR-502-5p过表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

分组	miR-502-5p	OD 值(490nm)	凋亡率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
miR-NC 组	1.00±0.05	0.94±0.08	5.82±0.43	126.42±11.54	99.57±7.05
miR-502-5p 组	2.55±0.22 ^a	0.56±0.04 ^a	18.65±1.18 ^a	65.71±4.63 ^a	55.29±3.69 ^a
<i>t</i>	20.611	12.746	30.647	14.648	16.694
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.01 vs miR-NC 组。

表7 miR-502-5p过表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭相关蛋白表达的影响

分组	Ki-67 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
miR-NC 组	0.66±0.04	0.54±0.04	0.27±0.02	0.88±0.04	0.74±0.04
miR-502-5p 组	0.31±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a	0.71±0.05 ^a	0.44±0.04 ^a	0.33±0.03 ^a
<i>t</i>	23.479	24.150	24.512	23.335	24.600
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.01 vs miR-NC 组。

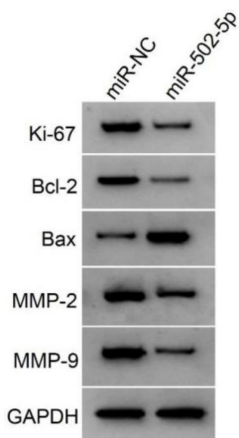


图6 增殖、凋亡、迁移侵袭相关蛋白表达。

miR-502-5p 组较 miR-NC 组增加 Y79 细胞 miR-502-5p 表达量、凋亡率,减少 OD 值、迁移及侵袭细胞数,以及降低 Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量,提高 Bax 蛋白表达量,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。

2.7 干扰 miR-502-5p 表达逆转了抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用 如表 8、9,图 7、8 所示,与 si-circ_0000144+anti-miR-NC 组比较,si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组 Y79 细胞 miR-502-5p 表达量、凋亡率减少,OD 值、迁移及侵袭细胞数增加,Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量升高,Bax 蛋白表达量降低,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。

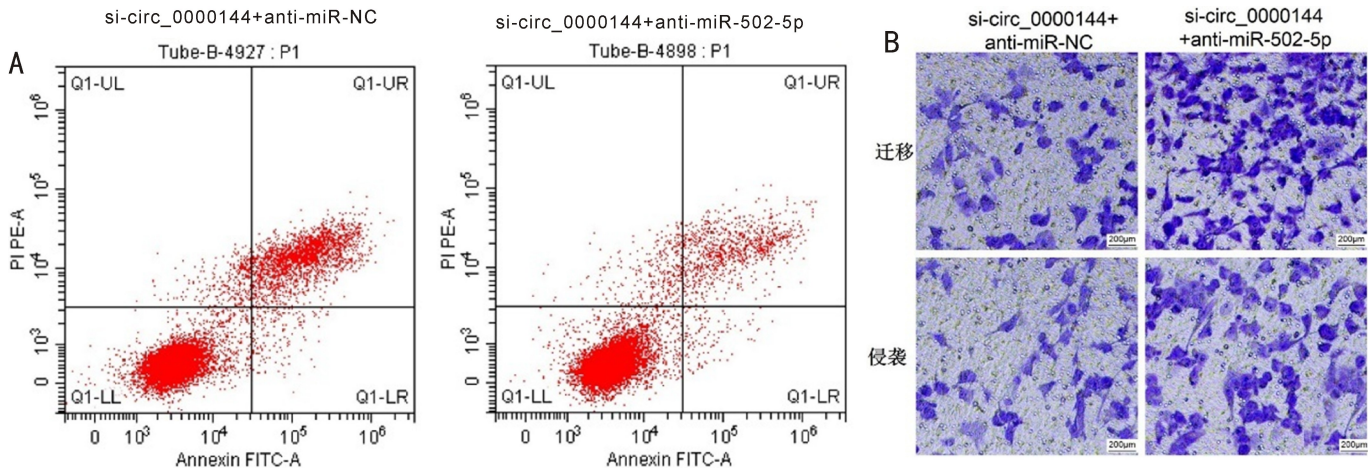


图7 干扰 miR-502-5p 表达逆转了抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡、迁移和侵袭的作用 A: 细胞凋亡流式图; B: 视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的迁移和侵袭(结晶紫染色)。

表8 干扰 miR-502-5p 表达逆转了抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用

(n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	miR-502-5p	OD 值(490nm)	凋亡率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
si-circ_0000144+anti-miR-NC 组	1.00±0.07	0.42±0.04	23.27±2.12	56.10±4.52	40.13±3.98
si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组	0.33±0.03 ^a	0.83±0.05 ^a	10.15±0.75 ^a	102.70±8.01 ^a	81.89±5.39 ^a
t	26.393	19.209	17.503	15.200	18.698
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.01 vs si-circ_0000144+anti-miR-NC 组。

表9 干扰 miR-502-5p 表达逆转了抑制 circ_0000144 表达对视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭相关蛋白表达的作用

(n=9, $\bar{x} \pm s$)

分组	Ki-67 蛋白	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
si-circ_0000144+anti-miR-NC 组	0.22±0.02	0.11±0.02	0.78±0.05	0.33±0.02	0.26±0.02
si-circ_0000144+anti-miR-502-5p 组	0.56±0.04 ^a	0.41±0.03 ^a	0.35±0.03 ^a	0.71±0.05 ^a	0.60±0.05 ^a
t	22.808	24.962	22.123	21.169	18.941
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.01 vs si-circ_0000144+anti-miR-NC 组。

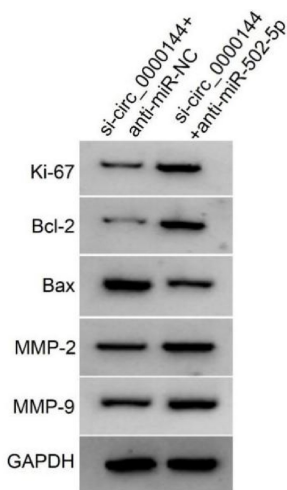


图8 增殖、凋亡、迁移侵袭相关蛋白表达。

3 讨论

在目前的研究中,我们确定 circ_0000144 在视网膜母细胞瘤组织中上调。功能研究表明, siRNA 对 circ_

0000144 的下调减弱了视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的增殖、迁移和侵袭特性,并加速细胞的凋亡。而增殖蛋白 Ki-67、抗凋亡蛋白 Bcl-2、转移蛋白 MMP-2、MMP-9 的上调,以及促凋亡蛋白 Bax 的下调也证明了这一结果。在既往的报道中, hsa_circ_0000144 的表达在胃癌细胞系中上调,可促进胃癌细胞的增殖,迁移和侵袭^[11]。circ_0000144 在甲状腺癌组织和甲状腺癌细胞系中的表达显著升高,其高表达与患者的肿瘤大小、患者的肿瘤大小和淋巴结转移显著相关。敲除 circ_0000144 可抑制甲状腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[12]。这些与本研究的结果相吻合,证实了 circ_0000144 在体外可促进视网膜母细胞瘤细胞增殖和转移,以及减少细胞凋亡,这为 circ_0000144 作为视网膜母细胞瘤致癌性 circRNA 提供了新的证据。

本研究 qRT-PCR 分析表明, miR-502-5p 在视网膜母细胞瘤组织中显著下调,表明其可能具有抑癌作用。然而 miR-502-5p 是否在视网膜母细胞瘤中起作用仍然未知。先前的研究表明, miR-502-5p 与肿瘤的生长和转移有关,例如 You 等^[13]报道,与邻近的正常组织相比,胃癌

肿瘤组织中的 miR-502-5p 明显下调,miR-502-5p 的过表达在体外减弱了胃癌细胞的增殖,迁移/侵袭并诱导了 G1 期阻滞,并且抑制了体内肿瘤的生长和转移。Ying 等^[14]揭示 miR-502-5p 在膀胱癌中被下调,miR-502-5p 的过表达在体外抑制膀胱癌细胞增殖和迁移。Peng 等^[15]鉴定了胃癌组织和细胞中低表达的 miR-502-5p,发现 miR-502-5p 通过靶向 SP1 来调节胃癌细胞的增殖,迁移和侵袭而充当抑癌基因。本研究观察到,miR-502-5p 过表达时,Y79 细胞凋亡率、Bax 蛋白表达量显著增加,细胞增殖、迁移及侵袭能力、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达量则显著减少。说明与既往报道^[13-15]一致,miR-502-5p 是视网膜母细胞瘤的肿瘤抑制剂,可以有效抑制视网膜母细胞瘤的发生发展。

越来越多的证据表明,某些 circRNA 可以通过充当 miRNA 海绵来调节 miRNA,并在转录控制中发挥重要作用^[16]。例如,胃癌中 circ_0032627 可以充当 miR-502-5p 的海绵^[17]。肝细胞癌中 circ-ZNF652 可以海绵化 miR-203^[18]。本实验中,Circular RNA Interactome 软件预测到 circ_0000144 与 miR-502-5p 的靶向结合,随后的双荧光素酶报告实验证实 circ_0000144 靶向调控 miR-502-5p 的表达。且上调 circ_0000144 时,miR-502-5p 表达被抑制,下调 circ_0000144 时,miR-502-5p 表达被促进,说明 circ_0000144 可以负调控 miR-502-5p 的表达。干扰 miR-502-5p 表达后,抑制 circ_0000144 表达对 Y79 细胞增殖、迁移和侵袭、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的抑制作用被逆转,其对细胞凋亡、Bax 蛋白表达的促进作用也被逆转。这些结果提示,circ_0000144 通过负调控 miR-502-5p 参与视网膜母细胞瘤细胞恶性进展。

总之,本研究表明,circ_0000144 在视网膜母细胞瘤组织中高表达,circ_0000144 的抑制通过调节 miR-502-5p 来减轻视网膜母细胞瘤的进展。当前的研究强调了 circ_0000144 作为肿瘤启动子在视网膜母细胞瘤中的潜在作用,因此 circ_0000144 是视网膜母细胞瘤治疗的潜在靶点。

参考文献

- 1 Qi D, Wang M, Yu F. Knockdown of lncRNA-H19 inhibits cell viability, migration and invasion while promotes apoptosis via micro RNA-143/RUNX2 axis in retinoblastoma. *Biomed Pharmacother* 2019; 109:798-805
- 2 Gudiseva H, Berry JL, Polski A, et al. Next-generation technologies and strategies for the management of retinoblastoma. *Genes* 2019; 10

- (12):1032
- 3 Wang Q, Zhu Y, Zuo G, et al. LINC00858 promotes retinoblastoma cell proliferation, migration and invasion by inhibiting miR-3182. *Exp Ther Med* 2020;19(2):999-1005
- 4 Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. *Breast Cancer* 2018;25(1):1-7
- 5 Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell* 2019;176(4):869-881.e13
- 6 Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. *J Cell Physiol* 2019;234(8):12369-12384
- 7 Mi L, Lei L, Yin X, et al. Circ_0000144 functions as a miR-623 sponge to enhance gastric cancer progression via up-regulating GPRC5A. *Biosci Rep* 2020;40(8):BSR20201313
- 8 Huang W, Lu Y, Wang F, et al. Downregulation of circular RNA hsa_circ_0000144 inhibits bladder cancer progression via stimulating miR-217 and suppressing RUNX2 expression. *Gene* 2018;678:337-342
- 9 Zeng J, Feng Q, Wang Y, et al. Circular RNA circ_001842 plays an oncogenic role in renal cell carcinoma by disrupting microRNA-502-5p-mediated inhibition of SLC39A14. *J Cell Mol Med* 2020; 24(17):9712-9725
- 10 Sun LL, Wang J, Zhao ZJ, et al. Suppressive role of miR-502-5p in breast cancer via downregulation of TRAF2. *Oncol Rep* 2014; 31(5):2085-2092
- 11 Wei J, Wang J, Gao X, et al. Identification of differentially expressed circRNAs and a novel hsa_circ_0000144 that promote tumor growth in gastric cancer. *Cancer Cell Int* 2019;19:268
- 12 Fan YX, Shi HY, Hu YL, et al. Circ_0000144 facilitates the progression of thyroid cancer via the miR-217/AKT3 pathway. *J Gene Med* 2020;22(12):e3269
- 13 You W, Liu X, Yu Y, et al. miR-502-5p affects gastric cancer progression by targeting PD-L1. *Cancer Cell Int* 2020;20:395
- 14 Ying Y, Li J, Xie H, et al. CCND1, NOP14 and DNMT3B are involved in miR-502-5p-mediated inhibition of cell migration and proliferation in bladder cancer. *Cell Prolif* 2020;53(2):e12751
- 15 Peng XB, Wu MH, Liu WX, et al. miR-502-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting SP1. *Oncol Lett* 2020;20(3):2757-2762
- 16 Li R, Jiang J, Shi H, et al. CircRNA: a rising star in gastric cancer. *Cell Mol Life Sci* 2020;77(9):1661-1680
- 17 Yin HF, Wang Q, Huang XT, et al. Circ_0032627 accelerates proliferation of gastric cancer cells through regulating miR-502-5p expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(12):6674-6681
- 18 Guo J, Duan H, Li Y, et al. A novel circular RNA circ-ZNF652 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through inducing snail-mediated epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-203/miR-502-5p. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;513(4):812-819