

## 舌鳞状细胞癌中环状RNA的表达谱特征

邹艾灵, 赵建江, 孙翔, 贾搏, 韩久松, 邱小玲, 褚洪星  
(南方医科大学口腔医院//广东省口腔医院口腔颌面外科, 广东广州 510280)

**摘要:**【目的】检测环状RNA(circRNA)在舌鳞状细胞癌组织及对应癌旁组织中表达谱的变化。【方法】利用高通量 circRNA 芯片检测技术,分析4对舌鳞状细胞癌组织及对应癌旁组织中 circRNA 表达谱的差异,确定两种组织中2倍以上变化并有显著差异( $P<0.05$ )的 circRNA 为差异表达 circRNA,通过将原始数据进行质控、过滤、归一化后,筛选出差异表达的 circRNA,并对其进行功能分析。【结果】芯片筛选出差异表达 circRNA 17 171 条,其中癌灶组织相对于癌旁组织高表达的共 9 982 条,低表达的共 7 189 条。【结论】在舌鳞状细胞癌组织与对应癌旁组织中, circRNA 表达谱发生了显著变化,部分差异表达的 circRNA 可能通过竞争性结合微小 RNA 调控舌鳞状细胞癌的发生发展。

**关键词:**环状 RNA;舌鳞状细胞癌;circRNA 芯片

**中图分类号:**R78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)02-0186-06

### Expression Profile of CircularRNA in Tongue Squamous Cell Carcinoma

ZOU Ai-ling, ZHAO Jian-jiang, SUN Xiang, JIA Bo, HAN Jiu-song, QIU Xiao-ling, CHU Hong-xing

(Department of Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University//Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China)

Corresponding to: ZHAO Jian-jiang, E-mail: zjj2521@sina.com

**Abstract:** 【Objective】To analyze the expression profile variation of circle RNA (circRNA) in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) tissue and para-carcinoma tissue. 【Methods】CircRNA microarray technology was performed to inspect the difference of circRNA expression in 4 cases of TSCC tissues and 4 cases of para-carcinoma tissues, and then make analysis after the quality control and homogenization of raw data, to identify which have more than 2 times variation and significant difference ( $P<0.05$ ) by statistical analysis as circRNA with differential expression. To perform functional analysis on circRNA with differential expression. 【Results】Compared with para-carcinoma tissue, there were 17171 circRNA differentially expressed in TSCC tissue, while 9982 increase more than 2 times and 7189 reduce more than 2 times. 【Conclusion】circRNA expression profile in TSCC changes significantly comparing with the para-carcinoma tissue, some differentially expressed circRNA may regulate the occurrence and progression of TSCC through a competitive combination of miRNA.

**Key words:** circle RNA; tongue squamous cell carcinoma (TSCC); circRNA microarray

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 186-191; 223]

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔颌面部头颈癌中最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,具有浸润性强、生长快、易向颈部淋巴

结转移等生物学行为。对舌鳞状细胞癌的传统治疗方法主要包括手术治疗、放疗和化疗,但患者尤其是晚期患者的预后较差,死亡率和复发率高<sup>[2]</sup>。

收稿日期:2017-10-23

基金项目:国家自然科学基金(81670950);广东省科技计划项目(2013B021800153);广州市科技惠民专项项目(2014Y2-00109);广东省自然科学基金(2015A030313787)

作者简介:邹艾灵,硕士,医师, E-mail: 851893819@qq.com;赵建江,通信作者,主任医师,博士生导师, E-mail: zjj2521@sina.com

研究表明,恶性肿瘤的形成往往不是基因突变本身所导致的,而与调控基因表达水平的过程密切相关<sup>[3-5]</sup>。研究舌鳞状细胞癌中相关基因的调控机制,对阐明舌鳞状细胞癌的发生机理具有重要意义。circRNA是新近确认的一类特殊的RNA分子,多为一个以上外显子通过反向剪接形成的环状RNA分子,大量存在于真核细胞,具有组织、时序和疾病特异性<sup>[6]</sup>。circRNA具有miRNA“海绵”作用,可通过与miRNA结合而抑制其活性,从而调控miRNA靶标以发挥作用<sup>[7]</sup>。另外circRNA还可通过调控基因转录、调控RNA结合蛋白、参与蛋白质翻译<sup>[8-10]</sup>来调控基因表达水平。研究表明circRNA在胃癌、神经胶质瘤、肺癌<sup>[11-13]</sup>等多种肿瘤的发生过程中起到重要作用。截至目前,circRNA与舌鳞状细胞癌之间的关系尚未见报道。本研究首次采用高通量circRNA芯片检测技术,筛选舌鳞状细胞癌中差异表达的circRNA,旨在探究与舌鳞状细胞癌相关的circRNA,为深入探讨circRNA对舌鳞状细胞癌的调控机制提供实验依据,考虑到circRNA的结构稳定性,其有巨大潜力成为新型的临床诊断标志物或治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本收集

收集4例2016年11月-2017年3月在南方医科大学口腔医院行手术治疗的舌鳞状细胞癌患者的癌灶组织和癌旁组织。要求每位患者均由病理检查确诊,术前未行放、化疗,身体无其他系统性疾病史,无其他肿瘤病史。其中男性3例,女性1例;年龄24-59岁,平均年龄50岁;根据TNM分期,T2N0M0共3例,T4N2M0共1例。根据术后病理,高分化2例,中分化2例。所有组织标本离体后立即置入冻存管于液氮中保存备用。标本采集均取得病人知情同意并经南方医科大学口腔医院伦理委员会审核通过。

### 1.2 芯片选择

芯片采用Capital Bio Technology Human CircRNA Array v2,全面覆盖CircBase、DeepBase、和Rybak-Wolf20151数据库,可同时检测170 340种circRNA,相比二代测序具有更高的检测效率。

### 1.3 样本total RNA的提取和质检

样本total RNA的提取按照Invitrogen公司的

Trizol试剂盒提供的标准操作流程进行,将所提取的total RNA进行质量检测,用NanoDrop ND-1000型分光光度仪测定样品在260nm、280nm波长的光密度值 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ 。最后使用甲醛变性胶对所有样本total RNA进行电泳检测。

### 1.4 cDNA合成、标记与杂交

以质检合格的total RNA为起始,反转录合成First strand cDNA,继而合成Second strand DNA,并以Second Strand cDNA为模板,体外转录合成cRNA,对纯化后的cRNA进行反转录得到cDNA并定量,按照Ambion WT Expression试剂盒的标准流程进行荧光标记,带有荧光基团的DNA即可用于芯片杂交。

### 1.5 芯片数据提取及分析

杂交扫描后的芯片采用Feature Extraction提款软件进行预处理分析,然后采用GeneSpring GX软件计算基因表达差异及其统计学检验的P值,差异基因的标准为癌灶组织相对癌旁组织表达变化2倍以上且 $P$ 值 $<0.05$ 。对差异circRNA对应mRNA转录本进行GO和Pathway富集分析,并对circRNA可能结合的miRNA进行预测。

## 2 结果

### 2.1 样本total RNA的提取与质检结果

从4对(8个)样本中提取的RNA总量均 $\geq 1 \mu\text{g}$ ,分光光度仪下 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ ,电泳条带清晰,28S:18S条带亮度大于或接近2:1,提示所有样本RNA质量符合表达谱芯片实验要求。

### 2.2 芯片检测结果与聚类分析

对4例癌灶组织和4例癌旁组织进行高通量circRNA芯片实验,并对结果进行预处理、归一化后,按配对样本筛选出差异表达的circRNA并绘制成火山图(图1),差异circRNA的标准为癌灶组织相对癌旁组织表达变化为2倍以上且 $P < 0.05$ 的circRNA。结果显示:共筛选出差异circRNA 17 171条,为芯片可检测circRNA的10.8%,其中2倍以上高表达的为9 982条,2倍以上低表达的为7 189条;5倍以上高表达的为2 032条,5倍以上低表达的为849条;10倍以上高表达的为392条,10倍以上低表达的为179条。对芯片的结果中差异50倍以上的circRNA进行描述,结果如表1。

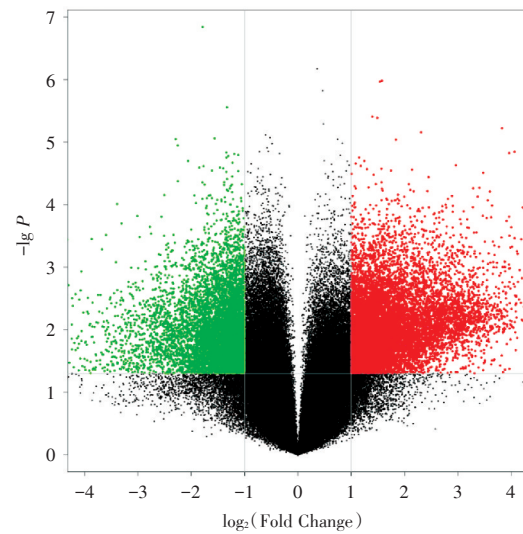
对8张芯片的数据进行聚类分析(图2),红色代表相对高的表达量,绿色代表相对低的表达量,表明差异 circRNA 能正确区分癌灶组织与癌旁组织,舌鳞状细胞癌中存在特征性表达的 circRNA。

### 2.3 circRNA-miRNA 网络构建

既往报道 circRNA 可作为 miRNA“海绵”,从而调控 miRNA 靶标以发挥作用。为挖掘本研究中差异 circRNA 的潜在生物学功能,运用 miRanda 软件预测其最可能结合的 miRNA(表1),选取其中与 miRNA 结合位点超过1个且差异倍数最大的10条 circRNA 绘制 circRNA-miRNA 网络图(图3),为进一步研究提供方向。

### 2.4 差异 circRNA 功能分析

将芯片结果运用 KOBAS 软件同时进行通路和功能分析。GO 富集分析显示,差异 circRNA 的亲本基因主要涉及到生物附着、细胞黏着、信号传递等生物过程(biological process, BP),细胞周边、细胞膜、隔膜等细胞组件(cellular component, CC),分子转导、受体活性、信号转导等分子功能(molecular function, MF)(图4)。KEGG\_PATHWAY 富集分析显示,差异 circRNA 的亲本基因主要涉



“Red” indicates high relative expression, and “Green” indicates low relative expression

图1 舌鳞状细胞癌癌灶组织(C)与癌旁组织(N)差异表达的 circRNA 火山图

Fig.1 Volcano plot of the differentially expressed profiles between TSCC and para-carcinoma tissue

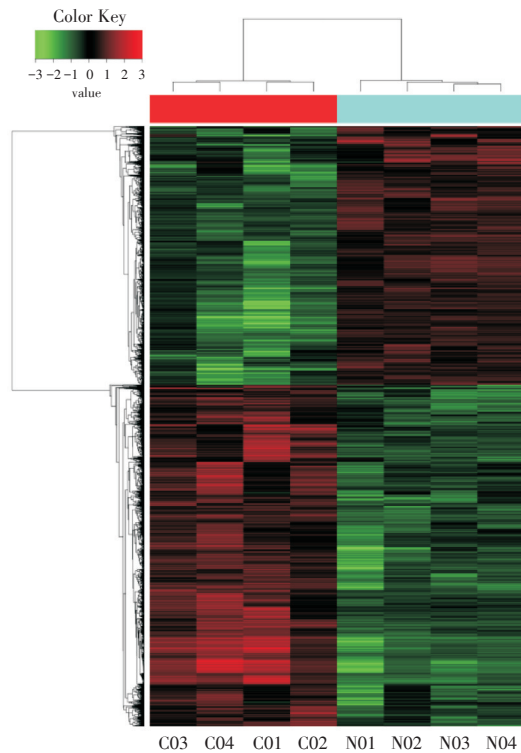
及到“ECM 受体相互作用”、“黏着斑”、“FcγR 介导的吞噬作用”等信号通路(图5)。

表1 芯片结果显示表达差异50倍以上的 circRNA

Table 1 A subset of the differentially expressed profiles with fold change > 50

CircRNA	Fold Change	Interacting miRNA
Up-regulated CircRNA		
hsa_circ_0034026	137.22	hsa-miR-1299, hsa-miR-3943, hsa-miR-4669, hsa-miR-431-5p
hsa_circ_0033967	116.31	hsa-miR-4739, hsa-miR-6797-5p, hsa-miR-8089, hsa-miR-608
hsa_circ_0000579	109.34	hsa-miR-6810-3p, hsa-miR-4298, hsa-miR-6810-5p, hsa-miR-608
hsa_circ_0024108	84.07	hsa-miR-185-3p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-4420, hsa-miR-4646-3p
hsa_circ_0024107	82.62	hsa-miR-185-3p, hsa-miR-4743-3p, hsa-miR-670-5p, hsa-miR-7108-5p
hsa_circ_0069909	77.12	hsa-miR-6756-5p, hsa-miR-6766-5p, hsa-miR-608, hsa-miR-1270
hsa_circ_0020377	66.36	hsa-miR-1267, hsa-miR-1912, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-3929
hsa-circRNA9331-7 <sup>1)</sup>	55.11	hsa-miR-6089, hsa-miR-1293, hsa-miR-1914-3p, hsa-miR-608
hsa-circRNA9331-4 <sup>1)</sup>	53.52	hsa-miR-1256, hsa-miR-1267, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1912
hsa_circ_0024109	52.29	hsa-miR-1183, hsa-miR-185-3p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-4420
Down-regulated CircRNA		
hsa_circ_0113500	95.44	hsa-miR-1200, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1254
hsa-circRNA11464-1 <sup>1)</sup>	74.24	hsa-miR-1184, hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-216a-3p, hsa-miR-637
hsa_circ_0099630	66.57	hsa-miR-4739, hsa-miR-6797-5p, hsa-miR-3192-5p, hsa-miR-4459
hsa-circRNA7690-15 <sup>1)</sup>	62.30	hsa-miR-1205, hsa-miR-1299, hsa-miR-2467-3p, hsa-miR-30b-3p
hsa-circRNA7690-12 <sup>1)</sup>	59.19	hsa-miR-1205, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1299, hsa-miR-197-5p

1) circ RNA ID from Deep Base. Other come from Circ Base



C01~C04: TSCC tissues; N01~N04: para-carcinoma tissues. Hierarchical clustering analysis arrange samples into groups based on their expression level, which allows us to hypothesize the relationships among samples. "Red" indicates high relative expression, and "Green" indicates low relative expression

图2 CircRNA 微阵列芯片检测结果聚类分析图

Fig.2 Differentially expressed circRNA were analyzed using hierarchical clustering

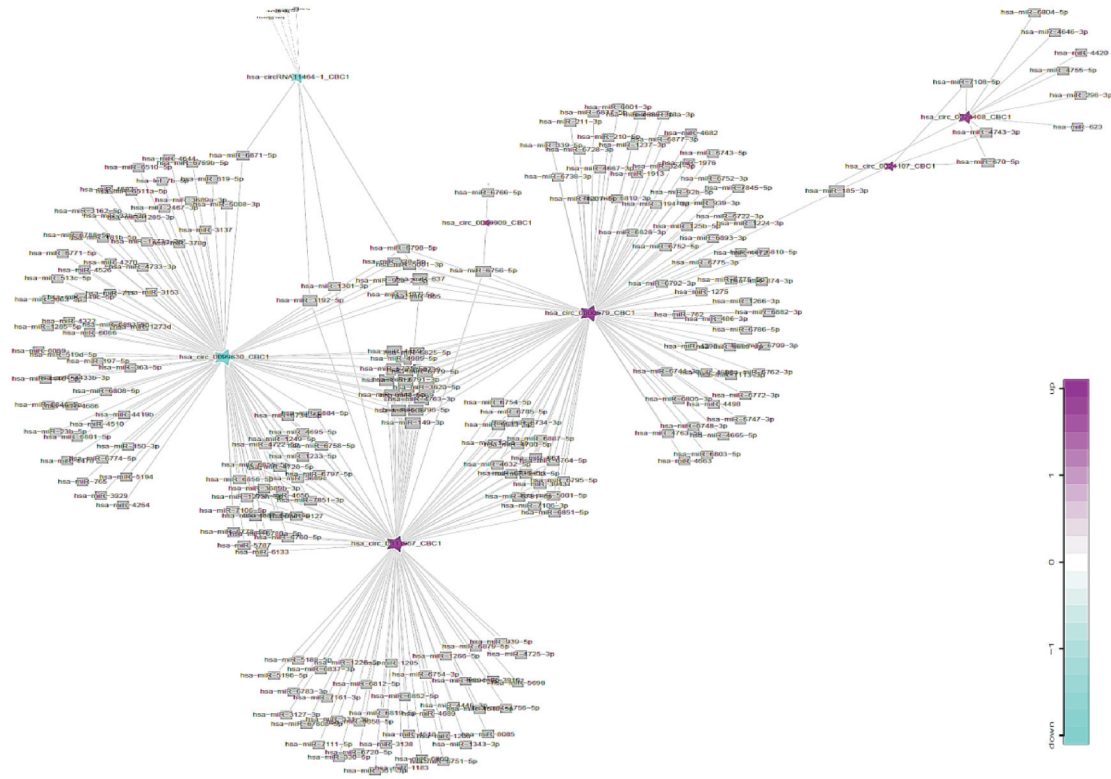
### 3 讨论

20世纪70年代, Sanger等<sup>[14]</sup>首次在高等植物中发现可致病的单链环状类病毒,这是人类首次发现 circRNA。在随后的时间里,人们陆续发现由结肠直肠癌缺失基因(delete in colorectal carcinoma gene, DCC)<sup>[15]</sup>、小鼠性别决定基因(sex-determining region Y, Sry)<sup>[16]</sup>等转录而来的 circRNA,并于1993年发现了人体细胞中的 circRNA<sup>[17]</sup>。然而在当时,人们对 circRNA 的功能并不了解,认为它是基因转录中的“噪音”,并未对其有太多关注。直到近年来,随着生物信息学技术和高通量芯片技术等的高速发展, circRNA 才真正走入人们的视野。基因芯片因其具有高通量、高效率等优势,成为研究基因功能的重要手段,被广泛应用于肿瘤领域的研究。Chen等<sup>[18]</sup>将 circRNA 芯片技

术应用于肝癌后放射性肝纤维化的研究,对正常人肝星状细胞株 LX2 细胞和接受 8 Gy X 线照射的 LX2 细胞进行检测,筛选得到差异 circRNA (变化 2 倍以上)共 809 条,其中高表达 179 条,低表达 630 条,沉默 hsa\_circ\_0071410 可缓解辐射诱导的肝星状细胞活化。Cheng 等<sup>[19]</sup>对人类卵巢颗粒细胞进行 circRNA 芯片检测,分别以 20 对年轻(YA,  $\leq 30$  years)及年长(AA,  $\geq 38$  years)的体外受精患者为实验组和对照组,结果显示在 AA 样品中有 46 条高表达的和 11 条低表达的 circRNA (变化 2 倍以上)。circRNA 成为了继 miRNA 后 RNA 家族的一颗新星,也是当前 RNA 领域最新的研究热点。

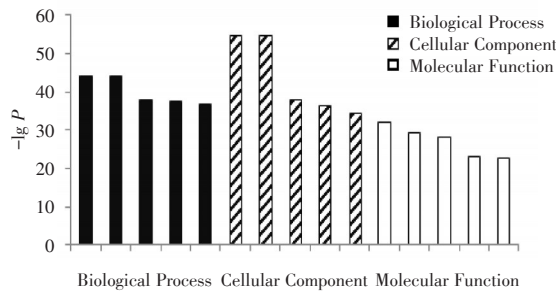
circRNA 是一类由 pre-mRNA 反向剪接形成的没有游离 5' 和 3' 末端的环形 RNA 分子,有很强的组织特异性,提示其具有重要功能<sup>[20]</sup>。近年来,越来越多研究表明 circRNA 在疾病中的重要作用与其充当 miRNA “海绵”有关。Hansen 等<sup>[7,21]</sup>于 2011 年首次发现小脑退化相关蛋白 1 反义转录物(antisense to the cerebellar degeneration-related protein1 transcript, CDR1as),它存在于人和小鼠脑组织细胞质中<sup>[6,9]</sup>,具有 74 个微小 RNA-7 (microRNA-7, miR-7) 的应答原件(miRNA response element, MRE),可大量竞争性结合 miR-7 以抑制其活性,从而调控 miR-7 靶标以发挥作用,其效率远远高于目前已知可作为 miR-7 海绵的线性 RNA。目前对 miR-7 的功能研究已相对成熟,它在乳腺癌、神经鞘瘤、肝癌等<sup>[22-24]</sup>疾病中通过作用于肿瘤相关信号通路中的重要蛋白发生作用,而充当其“海绵”的 circRNA 势必也在这些肿瘤的发生发展中扮演重要角色。Zhang 等<sup>[11]</sup>发现 circRNA\_100269 在胃癌组织中表达下调,并采用双荧光素酶测定证明了 circRNA\_100269 与 miR-630 直接相互作用,过表达 circRNA\_100269 可抑制细胞增殖。Zheng 等<sup>[20]</sup>也发现 circHIPK3 可作为 miR-124 的“海绵”负性调控其对细胞增殖的抑制作用。

本实验首次通过 circRNA 芯片技术检测舌鳞状细胞癌组织中 circRNA 表达谱特征,并经过对芯片结果的分析认为舌鳞状细胞癌中存在特征性表达的 circRNA。先前的研究认为绝大部分 circRNA 并不直接编码蛋白质,但可通过竞争性结合靶 miRNA 来调控基因表达。通过对本实验中差异表达最显著的 10 条 circRNA 进行靶 miRNA 预测,发现 3 条 circRNA 具有 hsa-miR-608 的潜在



Square represents miRNA, and Star represents circRNA. "Purple" indicates high relative expression, and "Blue" indicates low relative expression

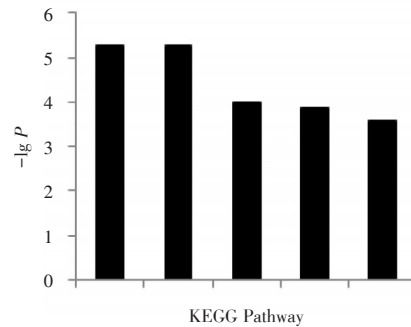
图3 CircRNA-miRNA 网络图  
Fig.3 CircRNA-miRNA network



Biological Process: biological adhesion; cell adhesion; signaling; single organism signaling; response to stimulus. Cellular Component: cell periphery; plasma membrane; membrane; plasma membrane part; membrane part. Molecular Function: molecular transducer activity; receptor activity; signal transducer activity; signaling receptor activity; transmembrane signaling receptor activity.

图4 差异 circRNA 亲本基因 GO 分析  
Fig.4 Significant Enriched GO Terms

结合位点,其中在癌灶组织相对癌旁组织表达明显上调的 hsa\_circ\_0033967(差异倍数 116.31)具有约 163 个 hsa-miR-608 潜在结合位点,miR-608



KEGG Pathway: ECM receptor interaction; Focal adhesion; Amoebiasis; Fc gamma R-mediated phagocytosis; Cell adhesion molecules (CAMs).

图5 差异 circRNA 亲本基因 KEGG 通路分析  
Fig.5 Significant enriched KEGG pathway terms

是近年来发现的在肝癌、胶质瘤<sup>[25-26]</sup>等多种肿瘤中发挥抑癌作用的 miRNA,这就提示 hsa\_circ\_0033967 可能成为 miR-608“海绵”,进而在舌鳞状细胞癌的发生发展中发挥调控作用。通过本实验,有望进一步完善 circRNA 的功能及分子作用机制。

在后续实验中,将从前期结果里挑选部分

circRNA,研究其在舌鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移等过程中发挥的作用,进行功能学验证,并通过体内实验明确其靶 miRNA 进行机制研究,以期

发现在舌鳞状细胞癌中发挥重要作用的特征性 circRNA 及其调控机制,为舌鳞状细胞癌的诊治提供新的思路及方向。

#### 参考文献

- [1] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications [J]. *Oral Dis*, 2009, 15(6): 388-399.
- [2] 郑家伟, 李金忠, 钟来平, 等. 口腔鳞状细胞癌临床流行病学研究现状[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2007, 5(02): 83-90.  
Zheng JW, Li JZ, Zhong LP, et al. Clinical epidemiology and risk factors of oral squamous cell carcinoma: An overview [J]. *China J Oral Maxillofac Surg*, 2007, 5(02): 83-90.
- [3] Dalglish GL, Furge K, Greenman C, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 360-363.
- [4] Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma [J]. *Nature*, 2011, 469(7331): 539-542.
- [5] van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. von Hippel-Lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathies in zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(5-6): 343-353.
- [6] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [7] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [8] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncodingRNAs [J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806.
- [9] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4414-4422.
- [10] Guo JU, Agarwal V, Guo H, et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(7): 409-415.
- [11] Zhang Y, Liu H, Li W, et al. CircRNA\_100269 is downregulated in gastric cancer and suppresses tumor cell growth by targeting miR-630 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(6): 1585-1594.
- [12] Song X, Zhang N, Han P, et al. Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e87.
- [13] Zhang N, Li X, Wu CW, et al. microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2013, 32(42): 5078-5088.
- [14] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [15] Nigro JM, Cho KR, Fearon ER, et al. Scrambled exons [J]. *Cell*, 1991, 64(3): 607-613.
- [16] Capel B, Swain A, Nicolis S, et al. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis [J]. *Cell*, 1993, 73(5): 1019-1030.
- [17] Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, et al. Missplicing yields circular RNA molecules [J]. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155-160.
- [18] Chen Y, Yuan B, Wu Z, et al. Microarray profiling of circular RNAs and the potential regulatory role of hsa\_circ\_0071410 in the activated human hepatic stellate cell induced by irradiation [J]. *Gene*, 2017, 629(8): 35-42.
- [19] Cheng J, Huang J, Yuan S, et al. Circular RNA expression profiling of human granulosa cells during maternal aging reveals novel transcripts associated with assisted reproductive technology outcomes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e177888.
- [20] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs [J]. *Nat*

(下转第219页 to page 219)