

论著·临床研究

基于高通量测序的结直肠癌组织中环状RNA功能研究与预后分析

傅中懋, 罗 再, 戎泽印, 章建明, 李腾飞, 余志龙, 黄 陈

上海交通大学附属第一人民医院普外科, 上海 200080

[摘要] **目的**·通过分析结直肠癌组织中环状RNA (circular RNA, circRNA) 的差异表达谱, 揭示结直肠癌的发生机制及差异表达 circRNA 与结直肠癌患者预后之间的关系。**方法**·收集上海交通大学附属第一人民医院普外科行结直肠癌根治术 12 例患者的肿瘤与癌旁正常组织, 使用高通量测序技术检测结直肠癌及癌旁组织中 circRNA 的表达情况。通过基因本体 (gene ontology, GO) 注释分析及京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 对差异表达的 circRNA 进行功能预测。在显著表达上调与下调的 circRNA 中各挑选 2 个 circRNA, 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 技术在 44 对结直肠癌组织中验证测序结果的准确性, 通过搜索公共数据库构建这 4 种 circRNA 与微 RNA (microRNA, miRNA) 特异性结合网络图。最后结合患者预后资料判断差异表达 circRNA 与预后的关系。**结果**·经高通量测序共检测出 20 924 个 circRNA。与癌旁正常组织比较在结直肠癌组织中异常显著表达的 circRNA 共有 373 个 ($|\log_2 FC| > 1$, $P < 0.05$), 其中显著上调的有 243 个, 显著下调的有 130 个。在 44 对结直肠癌样本中, RT-qPCR 验证结果与高通量测序数据筛选的 circRNA 表达趋势基本一致。通过绘制 circRNA-miRNA-mRNA 互作网络后发现, 与 circRNA 相关的 miRNA 与 mRNA 在结直肠癌患病过程中可能起着关键作用。结合患者预后信息, hsa_circ_0023984、hsa_circ_0008192 高表达的患者预后较差; hsa_circ_0020093、hsa_circ_0069922 高表达的患者预后较好。**结论**·结直肠癌组织中存在异常表达的 circRNA, 这对进一步研究 circRNA 在结直肠癌发生和发展中的作用机制奠定了基础, 对未来新型临床诊断标志物及治疗的发展提供有价值信息。

[关键词] 结直肠癌; 环状 RNA; 预后; 调控网络**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.02.010 **[中图分类号]** R735.3 **[文献标志码]** A

Study on the function and prognosis of circular RNA in colorectal cancer tissues based on high-throughput sequencing

FU Zhong-mao, LUO Zai, RONG Ze-yin, ZHANG Jian-ming, LI Teng-fei, YU Zhi-long, HUANG Chen

Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective**·To reveal the mechanism of colorectal cancer and the association between differential expression of circular RNAs (circRNAs) and patients' prognosis. **Methods**·Colorectal cancer tissues and normal tumor-adjacent tissues were harvested from 12 patients undergoing radical resection of colorectal cancer in the Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, and the expressions of circRNAs were detected by high-throughput sequencing. Function predictions of differentially expressed circRNAs were carried out by gene ontology (GO) annotation analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Two circRNAs were selected from the significantly up-regulated and down-regulated circRNAs respectively, and the accuracy of sequencing results was verified in 44 sets of colorectal cancer tissues by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). The circRNA-miRNA targeting binding network map was constructed by searching the public database for the four circRNAs. Finally, the relationships between differential expression of circRNAs and prognosis were determined based on the patients' clinical data. **Results**·A total of 20 924 differentially expressed circRNAs were detected after high-throughput sequencing. Compared with normal colorectal tissues, there were 373 circRNAs ($|\log_2 FC| > 1$, $P < 0.05$) abnormally and significantly expressed in colorectal cancer tissues, of which 243 were significantly up-regulated and 130 were significantly down-regulated. In 44 pairs of colorectal cancer samples, the results verified by RT-qPCR were basically consistent with the sequencing data. After the circRNA-miRNA-mRNA interactions being plotted, it was found that miRNA and target genes associated with circRNA may play an important role in the pathogenesis of colorectal cancer. Combined with the prognosis information, the patients with high expression of hsa_circ_0023984 or hsa_circ_0008192 had poorer prognosis while patients with high expression of hsa_circ_0020093 or hsa_circ_0069922 had better prognosis. **Conclusion**·Abnormally expressed circRNAs in colorectal cancer tissues lay a foundation for further studies on the occurrence and development of colorectal cancer, and provide valuable information for the development of new clinical diagnostic markers and treatments in the future.

[Key words] colorectal cancer; circular RNA (circRNA); prognosis; regulatory network**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81772526); 上海市教育委员会高峰高原学科建设项目 (20161425); 上海交通大学医工交叉项目 (YG2017MS28); 上海市松江区科技攻关项目 (18SJKJGG23, 19SJKJGG22)。**[作者简介]** 傅中懋 (1996—), 男, 硕士生; 电子信箱: fzmaloal@163.com。**[通信作者]** 黄 陈, 电子信箱: richard-hc@hotmail.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81772526); Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20161425); Shanghai Jiao Tong University Medical Engineering Cross Fund (YG2017MS28); Shanghai Songjiang Science and Technology Project Fund (18SJKJGG23, 19SJKJGG22)。**[Corresponding Author]** HUANG Chen, E-mail: richard-hc@hotmail.com。

结直肠癌是当今世界最常见的恶性消化道肿瘤之一, 每年新增结直肠癌患者人数为185万, 新增死亡人数为88万^[1]。在美国, 结直肠癌的发病率与病死率在男性和女性罹患的恶性肿瘤中均排第三^[2]。据我国肿瘤中心登记的数据显示, 2015年结直肠癌在总新发肿瘤中发病率与病死率均排第五^[3]。结直肠由可治愈的局部恶性病变发展到转移性结直肠癌需要经过一个漫长的时间窗, 因此早期诊断意义重大。目前, 结直肠癌检查主要为直肠指诊和结肠镜检查。由于侵入式检查会给患者带来不适感, 患者往往不愿意定期检查^[4]。计算机断层扫描检查虽然为非侵入性, 但由于其局限于形态成像, 可能会将残余粪便误诊为肿瘤而导致假阳性结果^[5], 因此血液源性生物标志物被认为是一种侵入性最小的选择。近年来, 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA19-9)、CA242等已被证实与结直肠癌的诊断和预后相关^[6]。但是这些指标的特异性往往有所欠缺, 例如在其他恶性肿瘤如卵巢癌、胰腺癌, 甚至在良性疾病如炎症性肠病中, CEA的水平也会升高^[7]。因此为了改善患者预后, 深入研究结直肠癌的发生机制, 挑选新型生物标志物至关重要。

随着二代测序技术与生物信息技术的发展, 人们对环状RNA(circular RNA, circRNA)的研究与认识越发深入。circRNA在哺乳动物中普遍存在, 作为一种不具有5'端帽子结构和3'端多腺苷酸尾部结构的特殊环状闭合RNA, 其结构稳定, 不易被核酸外切酶降解^[8]。由于circRNA的广泛性、组织发育阶段特异性、高度保守性等特点, 其具有成为新型临床诊断标志物的潜力^[9]。circRNA因其在真核生物中所具有的细胞或组织特异性以及发育阶段特异性, 已被证实参与不同疾病的致病过程^[10]。同时, circRNA结构特异性决定了其特有的生物学功能, 如调节蛋白翻译、基因转录等^[11]。目前, 越来越多的证据表明circRNA作为竞争性内源性RNA在细胞质参与miRNA结合竞争, 从而在致癌过程中发挥着重要作用, 如circNHSL1通过miR-1306-3p/SIX1/vimentin途径促进癌症进程^[12]。但是当前在结直肠癌中关于表达差异circRNA的选择、circRNA的生物学功能及其与患者预后关系的研究仍很少。

本研究通过对12对结直肠癌患者的新鲜结直肠癌组织和癌旁组织进行高通量测序分析, 筛选出表达差异的circRNA并进行功能预测, 借助实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)技术验证测序结果的准确性, 构建circRNA与微RNA(microRNA, miRNA)、mRNA的互作网络, 并初步研究差异表达的circRNA与患者预后的关系, 以期对结直肠癌发生机制与

新型临床标志物的筛选提供研究基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2017年1月—2018年12月在上海交通大学附属第一人民医院普外科行结直肠癌根治术的12例患者的癌组织和癌旁组织(距离癌组织>5 cm)用于高通量测序。收集2015年1月—2017年12月行结直肠癌根治术的44例患者的癌组织和癌旁组织(距离癌组织>5 cm), 用于RT-qPCR实验。纳入标准: ①符合结直肠癌诊断标准。②患者病历资料完整, 随访数据完整。③术前未经过新辅助放射治疗和化学治疗。④患者无其他系统严重疾病。排除标准: ①合并其他部位原发恶性肿瘤患者。②患者临床、随访资料不完整。组织标本取出后即刻放入液氮盒或-80℃冰箱保存。研究获上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会批准(批件编号2019SQ274)。所有患者或其家属均签署知情同意书。

1.2 circRNA高通量测序

RNA高通量测序由上海欧易生物医学科技有限公司提供。使用mirVana miRNA(AM1561, 中国Ambion)分离试剂盒提取样品总RNA, 用ribo-zero试剂盒(RS-122-2301, 美国Illumina)捕获并去除核糖体RNA, 用RNA碎片化试剂(AM8740, 美国ABI)将RNA片段化, 配置一链合成体系通过六碱基随机引物合成第一链cDNA, 随后在此基础上配置二链合成体系, 用上标II反转录酶(18064014, 美国Invitrogen)增加cDNA产量, 其中dUTP代替dTTP合成第二链cDNA, 用UNG酶法将富含dUTP的第一链消化, 将第二链cDNA进行纯化, 将纯化后的cDNA末端补平, 加A尾修饰和加测序接头, qPCR扩增构建测序文库。将构建好的文库使用安捷伦2100生物分析仪(5067-1511, 美国Agilent)检测RNA完整性, RNA完整性参数(RIN)≥7的样品进行后续分析, 在Illumina测序平台(HiSeq 2500, 美国Illumina)对这些文库进行测序。最后根据筛选标准: 基因表达值倍数变化(fold change, FC)>2或FC<-2, P<0.05进行差异显著circRNA筛选。

1.3 差异表达circRNA的功能预测分析

1.3.1 差异表达circRNA GO富集分析 基因本体(gene ontology, GO)分析主要通过分析细胞组分、分子功能、生物过程3个方面来描述基因行使的主要功能。在得到差异表达的circRNA后, 根据circRNA来源基因的GO功能

注释信息,计算每个GO条目中差异表达的circRNA数量,超几何分布检验差异 circRNA 在 GO 条目中富集的程度,以 $P<0.05$ 为阈值筛选显著富集的 GO 条目,结合 GO 注释结果,预测差异表达的 circRNA 所行使的主要生物学功能。

1.3.2 差异表达 circRNA KEGG 信号通路分析 circRNA 信号通路分析主要依赖于京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 公共数据库,通过基因的 KEGG 注释结果研究疾病信号通路和转导。在得到差异表达的 circRNA 后,计算统计每个信号通路中差异 circRNA 来源基因的富集程度,根据 $P<0.05$ 进行 KEGG 富集通路筛选分析。

1.4 RT-qPCR 验证分析

在筛选出的具有表达差异的 circRNA 中各挑选 2 个显著上调与显著下调的 RNA,在 44 对结直肠癌组织与癌旁组织中进行 RT-qPCR 验证 circRNA 含量;其中挑选的上调的 circRNA 为表达差异倍数最大前 5 中的 hsa_circ_0023984 与 hsa_circ_0008192,挑选的下调的 circRNA 为表达差异倍数最大的 hsa_circ_0020093 与 hsa_circ_0069922。4 个 circRNA 和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因的引物序列如表 1 所示。首先使用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (RR036A, 日本 TaKaRa) 反转录 500 ng RNA 为 cDNA,然后用 SYBR®Premix Ex Taq™ (RR820A, 日本 TaKaRa) 扩增 cDNA 进行 RT-qPCR。将 GAPDH 作为内部对照,用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 circRNA 的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Primer sequence (5'→3')
hsa_circ_0023984	Forward 5'-GTCAGTATATTACTCTACATTGTCCAG-3'
	Reverse 5'-TCTAAATTAGTTTGATACTTCAGCAGC-3'
hsa_circ_0008192	Forward 5'-TGTCAGTGCCGTCCAATC-3'
	Reverse 5'-GCGAACAGGGAGGTCTAT-3'
hsa_circ_0020093	Forward 5'-CGGTTACTGTGACCTGACTGGAG-3'
	Reverse 5'-TGGGCCATCTGTAAATATCCAG-3'
hsa_circ_0069922	Forward 5'-GCTGATGAATCCAGCAGCAGC-3'
	Reverse 5'-TCCAGGACAGCTTCATCCTCC-3'
GAPDH	Forward 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	Reverse 5'-ACCACCTGTTGCTGTAGCAA-3'

1.5 circRNA-miRNA 靶向作用预测

挑选上述实验的差异表达 circRNA,通过 CircInteractome 分析网站挑选具有潜在结合 circRNA 能力

的 miRNA,根据结合位点个数及 context+score percentile 评分综合筛选出最优的 miRNA。接着通过 MicroRNA、TargetScan 与 TangetMiner 网站对筛选的 miRNA 进行靶基因预测,取 3 个预测结果的交集,得到 miRNA 靶基因。最后根据度分析指标在 Cytoscape 软件上构建 circRNA-miRNA-mRNA 网络。

1.6 患者预后分析

将表达上调的 hsa_circ_0023984、hsa_circ_0008192 与表达下调的 hsa_circ_0020093 与 hsa_circ_0069922 按照表达水平高低与 44 例结直肠癌患者临床资料相匹配,通过分析总生存期 (overall survival, OS) 研究表达上调或下调的 circRNA 与患者预后之间的联系。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析。测量 circRNA 表达量的 RT-qPCR 实验重复 3 次,最终结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。结直肠癌组与癌旁正常组之间 circRNA 表达水平的比较采用配对 t 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

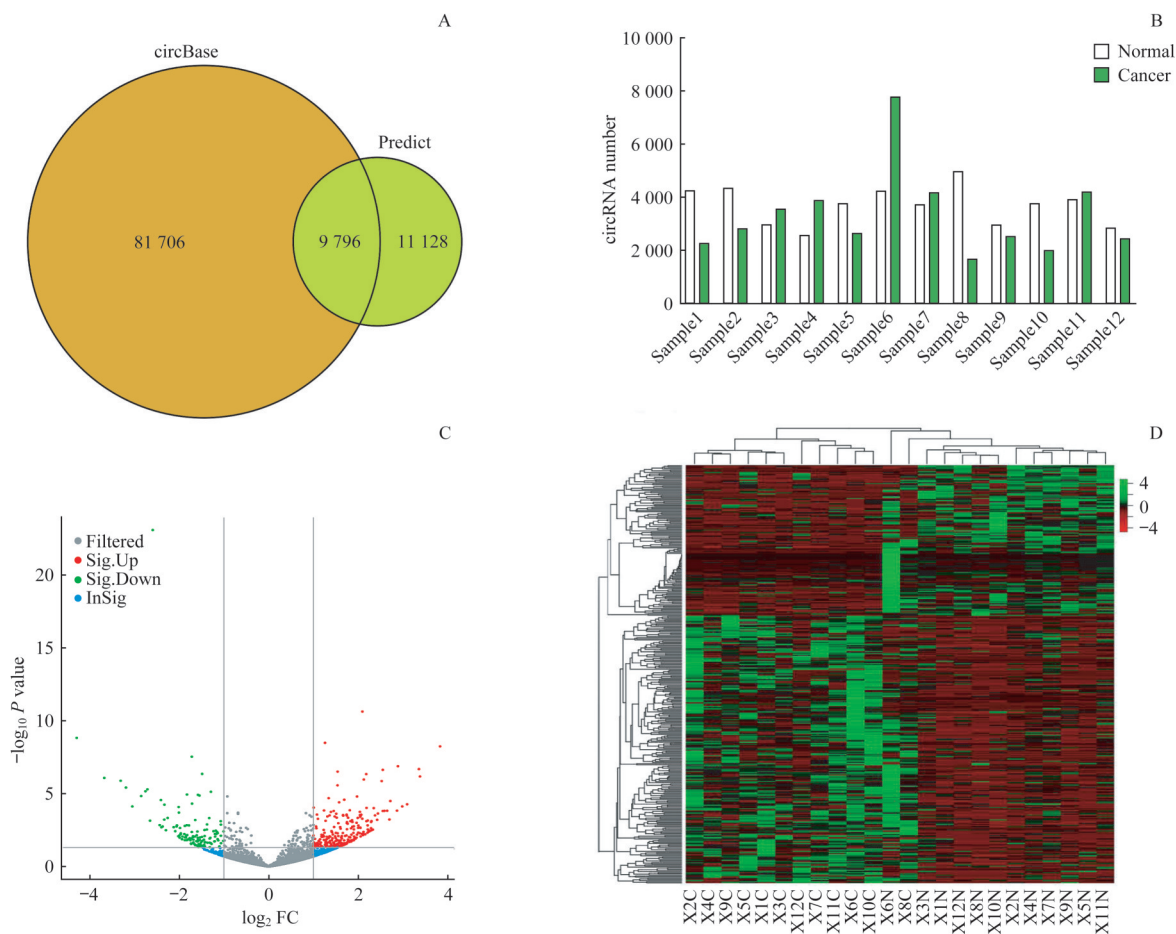
2 结果

2.1 结直肠癌组织中 circRNA 的表达分析

经高通量测序后共检测出 20 924 个 circRNA,其中有 9 796 个 circRNA 在 circBase 数据库中,第 6 对样本预测表达 circRNA 数量最多 (图 1A、B)。相较于正常的结直肠癌旁组织,在结直肠癌组织中异常显著表达的 circRNA 共有 373 个 ($|\log_2FC|>1$, $P<0.05$),其中上调显著的有 243 个,下调显著的有 130 个。将有显著差异表达的 circRNA 数据制成火山图 (图 1C) 和聚类分析热图 (图 1D),在 RNA 测序结果中筛选上调与下调最显著的 5 个 circRNA,具体信息见表 2。其中 hsa_circ_0079534 表达上调最多,FC 为 14.24; hsa_circ_0020093 下调最明显,FC 为 -8.27。

2.2 结直肠癌组织中 circRNA 的功能分析

通过 GO 富集分析与 KEGG 通路分析预测差异表达 circRNA 的功能。部分差异表达的 circRNA 对应 1 个 GO 注释,分别根据生物过程、细胞定位、分子功能 3 个部分对应将最富集的前 10 条筛选出来。差异显著 circRNA 在生物过程预测显示较为富集的是细胞排泄、细胞内源性 pH 的调节、对 cAMP 合成过程的负向调控以及对草酸运输调控等;其细胞定位主要在生殖核、纺锤体中央区、细胞质膜以及刷状缘膜等处;差异表达的 circRNA 分子功能分析提示结直肠癌发病机制与部分转运蛋白活性密切相关,如



Note: A. Intersection between the predicted circRNA and the circBase database. B. Number of circRNAs differentially expressed between colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues in the 12 pairs of samples. C. Volcanic map. Green dots represent significantly down-regulated circRNAs; red dots represent significantly up-regulated circRNAs; gray dots represent no significant difference in circRNAs. D. Cluster analysis. Red box represents low expression circRNAs and green represents high expression circRNAs.

图1 结直肠癌组织及癌旁组织中差异表达 circRNA 的可视化分析

Fig 1 Visual analysis of the differential expression of circRNAs in colorectal cancer and adjacent tissues

表2 circRNA 测序结果中表达差异最显著的 10 种 circRNA

Tab 2 Ten circRNAs with the most significant expression in the sequencing result

circRNA ID	FC	P value	Regulation	circRNA chromosome	Gene
hsa_circ_0079534	14.24	<0.001	Up	NC_000007.14:20154193_20161870_-	MACC1
hsa_circ_0023984	10.43	<0.001	Up	NC_000011.10:89400017_89402542_-	NOX4
hsa_circ_0008192	10.27	<0.001	Up	NC_000009.12:112262435_112297916_-	PTBP3
hsa_circ_0008694	8.55	<0.001	Up	NC_000020.11:51712966_51729978_-	ATP9A
hsa_circ_0004705	7.40	<0.001	Up	NC_000003.12:14443624_14447816_+	SLC6A6
hsa_circ_0020093	-8.27	<0.001	Down	NC_000010.11:115120185_115129535_+	ATRNL1
hsa_circ_0069922	-7.22	<0.001	Down	NC_000004.12:71236576_71255399_+	SLC4A4
hsa_circ_0073244	-6.54	<0.001	Down	NC_000005.10:84060300_84066606_-	EDIL3
hsa_circ_0005720	-5.31	0.001	Down	NC_000001.11:95143891_95173889_+	TMEM56
hsa_circ_0008676	-5.26	0.002	Down	NC_000004.12:71339370_71357187_+	SLC4A4

Note: *MACC1*—metastasis-associated in colon cancer 1; *NOX4*—nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4; *PTBP3*—polypyrimidine tract-binding protein 3; *ATP9A*—ATPase phospholipid transporting 9A; *SLC6A6*—solute carrier family 6 member 6; *ATRNL1*—attractin like 1; *SLC4A4*—solute carrier family 4 member 4; *EDIL3*—EGF like repeats and discoidin domains 3; *TMEM56*—TLC domain containing 4.

硫酸盐跨膜转运蛋白与次级活性硫酸盐跨膜转运蛋白活性、草酸跨膜转运蛋白活性、G 蛋白偶联受体活性等 (图 2A)。KEGG 通路分析表明, 在 circRNA 相关通路中最富集的通路是对肿瘤微环境中蛋白聚糖的调控, 同时 circRNA 调控的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF) 信号通路、趋化因子信号通路、红细胞白血病病毒癌基因同源物 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog, ErbB) 信号通路与结直肠癌发生息息相关, circRNA 相关的白细胞经内皮迁移也可能参与了结直肠癌的致病过程 (图 2B)。



Note: A. GO analysis. X coordinate is the GO item name; Y coordinate is $-\log_{10} P \text{ value}$. B. KEGG analysis. The X axis is the enrichment score; The larger the bubble is, the more circRNA the item contains; The color of the bubble changes from purple to blue to green to red; The smaller the enrichment $P \text{ value}$, the greater the significance.

图2 差异表达 circRNA 的 GO 分析和 KEGG 分析

Fig 2 GO analysis and KEGG analysis of differentially expressed circRNAs

2.3 RT-qPCR检测结果与circRNA-miRNA-mRNA网络分析

在所有差异表达的circRNA中挑选出表达差异最显著的4个circRNA,分别为hsa_circ_0023984、hsa_circ_0008192、hsa_circ_0020093与hsa_circ_0069922。前两者在测序结果中预测表达上调,后两者预测表达下调。我们在44对结直肠癌及癌旁组织样本中使用RT-qPCR技术进一步验证circRNA测序结果的准确性。用于RT-qPCR验证的44例患者年龄为35~84岁,男性26例,女性18例;患者分期依据国际抗癌联盟第8版结直肠癌TNM分期标准:I期3例,II期19例,III期20例,IV期2例。结果(图3A)显示:hsa_circ_0023984在结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织中的相对表达量分别为 $0.179\ 6\pm0.446\ 6$ 与 $0.012\ 2\pm0.017\ 4$ ($t=2.480$, $P=0.017$); hsa_circ_0008192在结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织中的相对表达量分别为 $0.089\ 4\pm0.186\ 7$ 与 $0.032\ 6\pm0.052\ 4$ ($t=2.190$, $P=0.034$); hsa_circ_0020093在结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织中的相对表达量分别为 $0.057\ 8\pm0.146\ 1$ 与 $0.457\ 6\pm0.625\ 5$ ($t=4.725$, $P<0.000\ 1$); hsa_circ_0069922在结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织中的相对表达量分别为 $0.030\ 9\pm0.030\ 9$ 与 $0.409\ 5\pm0.279\ 4$ ($t=8.645$, $P<0.000\ 1$)。通过RT-qPCR证实了circRNA测序结果的准确性。

利用CircInteractome、MicroRNA、TargetScan等网站对上调明显的hsa_circ_0023984和hsa_circ_0008192及下调显著的hsa_circ_0020093和hsa_circ_0069922进行下游miRNA及最终调控的mRNA预测。根据预测结果优先选择相关系数最高的4个miRNA和20个mRNA构建circRNA-miRNA-mRNA互作网络,通过Cytoscape软件将其可视化为核心网络图(图3B)。该图显示含锌指和BTB结构域蛋白1(zinc finger and BTB domain containing 1, *ZBTB1*)、SEC23同源物A(SEC23 homolog A, *SEC23A*)、脆性X智力低下蛋白翻译调节蛋白1(FMRP translational regulator 1, *FMR1*)、烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, *NAMPT*)、具有植物同源结构域的锌指蛋白20样蛋白1(PHD finger protein 20 like 1, *PHF20L1*)等为靶向关系最多的mRNA原始基因。

2.4 差异表达circRNA与患者预后的关系

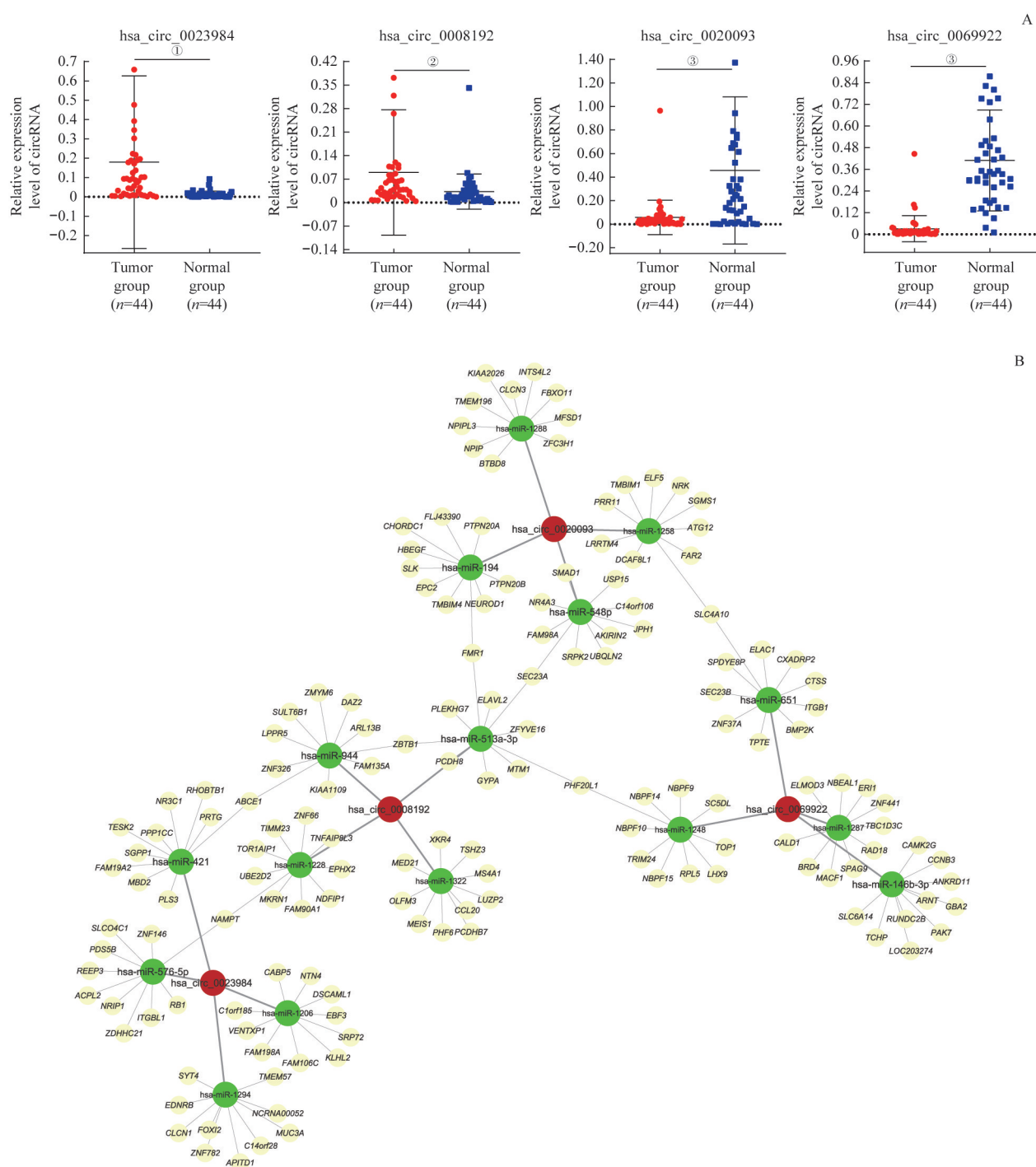
结合患者的临床资料,通过Kaplan-Meier生存分析显示,hsa_circ_0008192在患者肿瘤组织中高表达时其OS较差($P=0.026\ 2$),同时对于hsa_circ_0023984高表达的患者OS也趋于变短($P=0.039\ 8$)(图4A、B)。

hsa_circ_0020093在患者肿瘤组织中高表达时其OS较好($P=0.000\ 1$,图4C),对于同样表达下调的hsa_circ_0000111也有类似的结果($P=0.002\ 2$,图4D)。我们的研究结果提示,差异表达的circRNA可能是判断结直肠癌患者预后的一个独立且有价值的指标。

3 讨论

尽管当前结直肠癌总的发病率与病死率持续下降,但进展期的结直肠癌依旧给公共卫生体系带来极大的负担;进一步研究结直肠癌的发病机制对早期识别结直肠癌与指导治疗有着重要的意义^[13]。circRNA作为单链共价闭合的RNA分子,具有与线性RNA完全不同的结构,其3'末端和5'末端连接在一起构成了特殊的环状结构^[14]。circRNA的稳定性很大程度由其结构决定。由于circRNA缺乏类似线性RNA的3'尾和5'帽子结构,其在很大程度避免了脱帽反应、脱腺苷化反应等相关的线性RNA降解方式,因此细胞质中circRNA的半衰期可达48 h以上而线性RNA半衰期均仅为10 h^[15-16]。与此同时,circRNA在不同组织及不同发育阶段存在特异性表达^[9]。目前越来越多研究^[12,17]发现,circRNA与肿瘤的发生与促进肿瘤的进展密切相关。在肿瘤组织中差异表达的circRNA如胃癌中高表达circ*MLLT10*的患者预后明显更差,提示circRNA可作为判断肿瘤患者预后的生物标志物^[18]。由于circRNA所具有的稳定性和细胞类型或发育阶段特异性、结构保守性,使circRNA可能成为新型生物诊断标志物^[9]。因此,研究circRNA在结直肠癌中的作用意义重大。

本研究通过高通量测序获得了结直肠癌circRNA表达数据库,从2万多个circRNA中筛选了具有显著表达差异的373个circRNA。在对表达差异的circRNA进行功能分析时,我们通过GO分析和KEGG通路注释分析预测了这些circRNA的潜在功能。在GO分析中显示,在生物学过程中最富集的是细胞排泄与对细胞内源性pH的调节,分别各有6种circRNA与此过程相关。在细胞定位分析中发现差异表达的circRNA大多都分布在细胞质膜上,这与circRNA主要位于细胞质或储存于外泌体中相一致^[19]。分子功能分析提示结直肠癌的发病机制与部分转运蛋白活性密切相关;目前已有研究已经证实了在结直肠癌中circRNA与转运蛋白如G蛋白偶联受体之间存在联系^[20]。将这些差异表达的circRNA进行KEGG信号通路富集分析发现,共有173条通路与结直肠癌发生机制密切相关,其中包括了VEGF信号通路、趋化因子信号通路、ErbB



Note: A. RT-qPCR was performed for 4 different circRNAs—hsa_circ_0023984, hsa_circ_0008192, hsa_circ_0020093 and hsa_circ_0069922 in 44 colorectal cancer tumor and normal tissues. B. circRNA-miRNA-mRNA network plot. Red circles represent circRNA; green circles represent miRNA; yellow circles represent mRNA. ① $P=0.017$, ② $P=0.034$, ③ $P<0.0001$.

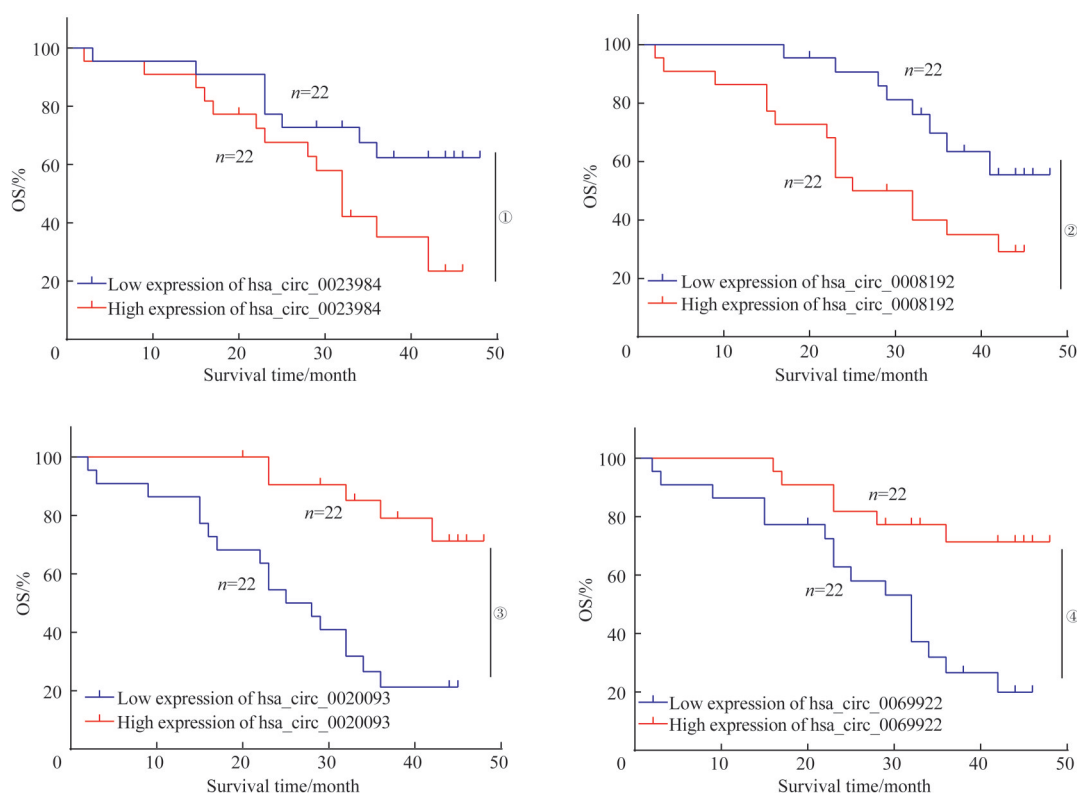
图3 circRNA差异表达及circRNA-miRNA-mRNA网络图

Fig 3 Differential expression of circRNA and circRNA-miRNA-mRNA network plot

信号通路等。对于结直肠癌中的 VEGF 信号通路, Li 等^[21]发现 circCCT3 通过充当 miR-613 的海绵来调节 VEGF 信号, 从而促进结直肠癌的远处转移。此外 Zhong 等^[22]发现 circMYLK 可充当 miR-29a 的竞争性内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA), 通过激活血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A,

VEGFA) /血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 和下游 Ras/细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) 信号通路来促进上皮间质转换, 从而导致膀胱癌的进展。

此外, 我们在 circRNA 表达数据库挑选了显著上调



Note: ① $P=0.026$ 2, ② $P=0.039$ 8, ③ $P=0.000$ 1, ④ $P=0.002$ 2.

图4 4种差异表达circRNA的临床预后分析

Fig 4 Clinical prognosis analysis of four differentially expressed circRNAs

和显著下调共4个circRNA在44对新鲜的结直肠癌组织及其癌旁组织中进行了RT-qPCR分析,验证结果与在测序结果中验证基本一致。结合患者的临床资料,初步研究了高表达与低表达的circRNA与患者预后的关系。结果发现结直肠癌组织中高表达的 hsa_circ_0008192 和 hsa_circ_0023984 患者 OS 较差,而高表达的 hsa_circ_0020093 和 hsa_circ_0069922 患者 OS 较好。但考虑患者的例数较少,我们准备在后续实验中扩大样本量继续验证。

在目前已知的 circRNA 中,仅有少部分同时含内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)和小开放阅读框(small open reading frame, sORF)结构才可翻译并编码多肽。如在肝癌中高表达的 circ β -catenin 可以通过编码多肽 β -catenin-370aa 来减弱 β -catenin 磷酸化,从而激活 Wnt/ β -catenin 通路,促进肝癌的进展^[23]。在结直肠癌中,差异表达的 circLgr4 通过编码多肽 Lgr4-aa 来激活 Wnt/ β -catenin 通路经上皮间质转换促进结直肠癌转移^[24]。大多数 circRNA 通过与 miRNA 形成 ceRNA,负向调控 miRNA 的功能使其靶基因表达失调,参与并促进肿瘤发生和进展^[21-22,25]。因此,我们对挑选的4个 circRNA 进行了 circRNA-miRNA-mRNA 的靶向预测,发现了 ZBTB1、SEC23A、FMR1、NAMPT、PHF20L1 等为靶向

关系最多的 mRNA 原始基因。

在这些靶向基因中,由烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT)基因编码的蛋白是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)生物合成过程中的关键酶。它可在组织或细胞水平影响机体代谢、细胞增殖分化与凋亡,尤其是衰老过程。NAMPT 在人类多种恶性肿瘤中上调,包括乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、胃癌和多种造血系统恶性肿瘤^[26-27]。与此同时,在一些恶性肿瘤如胃癌、甲状腺癌和前列腺癌中, NAMPT 的表达与肿瘤侵袭和化学治疗耐药相关^[28]。有文献^[29]也报道了在结直肠癌中 NAMPT 明显上调,且 NAMPT 通过控制干细胞信号途径增加了癌症起始细胞的数量,从而导致了结直肠癌的发生。通过对 circRNA 网络的分析, hsa-miR-576-5p 与 hsa-miR-1228 与 NAMPT 关系密切,因此我们推测 hsa_circ_0008192 或 hsa_circ_0023984 高表达患者 OS 总体变短可能与 circ0023984-miR-576-5p-NAMPT 或 circ0008192-miR1228-NAMPT 调控轴相关。

综上,本研究利用高通量测序筛选了差异表达的 circRNA 并对相应功能进行分析,用 RT-qPCR 验证了测序结果的准确性,结合患者资料分析了预后,此外构建了部分与结直肠癌密切相关的 circRNA-miRNA-mRNA 调控

轴。在后续研究中,我们将从体内外方向共同验证和完善本研究预测的 circRNA-miRNA 靶向结合网络,旨在进

一步研究结直肠癌发病机制,从而为结直肠癌的早期诊断与治疗提供新的研究思路。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Zhang H, Wang Z, Ma R, et al. MicroRNAs as biomarkers for the progression and prognosis of colon carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 2080-2088.
- [5] Sun K, Han RJ, Han Y, et al. Accuracy of combined computed tomography colonography and dual energy iodine map imaging for detecting colorectal masses using high-pitch dual-source CT[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3790.
- [6] Thomsen M, Skovlund E, Sorbye H, et al. Prognostic role of carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in metastatic colorectal cancer: a *BRAF*-mutant subset with high CA 19-9 level and poor outcome[J]. Br J Cancer, 2018, 118(12): 1609-1616.
- [7] Gao Y, Wang J, Zhou Y, et al. Evaluation of serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and ferritin as diagnostic markers and factors of clinical parameters for colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2732.
- [8] Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388.
- [9] 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.
- [10] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of circRNAs[J]. Mol Cell, 2017, 66(1): 9-21. e7.
- [11] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions[J]. Dev Camb Engl, 2016, 143(11): 1838-1847.
- [12] Zhu Z, Rong Z, Luo Z, et al. Circular RNA circNHS1 promotes gastric cancer progression through the miR-1306-3p/SIX1/vimentin axis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 126.
- [13] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164.
- [14] Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs[J]. RNA, 2015, 21(2): 172-179.
- [15] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157.
- [16] Schwahnhauser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control[J]. Nature, 2011, 473(7347): 337-342.
- [17] Vo JN, Cieslik M, Zhang YJ, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. Cell, 2019, 176(4): 869-881. e13.
- [18] Zhu Z, Yu Z, Rong Z, et al. The novel GINS4 axis promotes gastric cancer growth and progression by activating Rac1 and CDC42[J]. Theranostics, 2019, 9(26): 8294-8311.
- [19] Li Y, Zheng QP, Bao CY, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981-984.
- [20] Zhu P, Zhu X, Wu J, et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3[J]. Nat Immunol, 2019, 20(2): 183-194.
- [21] Li WL, Xu YQ, Wang XD, et al. circCCT3 modulates vascular endothelial growth factor A and Wnt signaling to enhance colorectal cancer metastasis through sponging miR-613[J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(1): 118-125.
- [22] Zhong Z, Huang M, Lv M, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2017, 403: 305-317.
- [23] Liang WC, Wong CW, Liang PP, et al. Translation of the circular RNA circ β -catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway[J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 84.
- [24] Zhi X, Zhang J, Cheng Z, et al. circLgr4 drives colorectal tumorigenesis and invasion through Lgr4-targeting peptide[J]. Int J Cancer, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32549.
- [25] Rong DW, Sun HD, Li ZX, et al. An emerging function of circRNA-miRNAs-mRNA axis in human diseases[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 73271-73281.
- [26] Galli M, van Gool F, Rongvaux A, et al. The nicotinamide phosphoribosyltransferase: a molecular link between metabolism, inflammation, and cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 8-11.
- [27] Garten A, Schuster S, Penke M, et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(9): 535-546.
- [28] Sampath D, Zabka TS, Misner DL, et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2015, 151: 16-31.
- [29] Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, et al. NAMPT is a potent oncogene in colon cancer progression that modulates cancer stem cell properties and resistance to therapy through Sirt1 and PARP[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(5): 1202-1215.

[收稿日期] 2020-04-26

[本文编辑] 徐 敏

