

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.001>

· 论著 ·

环状非编码 RNA circ-ZNF652 对卵巢癌增殖和迁移的影响及机制

吴文, 李丹

(华中科技大学同济医学院附属协和医院西院妇产科, 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨环状非编码RNA circ-ZNF652在卵巢癌细胞系中的表达及对增殖和迁移的影响和机制。方法: 采用qPCR法检测circ-ZNF652在卵巢癌细胞系PA-1, Caov-3, Caov-4, SK-OV-3及正常卵巢上皮细胞系HPOSEC, SV40中的表达。将SK-OV-3细胞分别转染circ-ZNF652敲降质粒(si-circ-ZNF652组)与阴性对照质粒(si-control组), 野生型SK-OV-3细胞作为空白对照组(Control组), 分别使用CCK-8法、细胞划痕实验检测3组细胞的细胞活力及迁移能力, 蛋白质印迹法测定蛋白激酶B(Akt)和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)磷酸化情况。结果: 卵巢癌细胞系中circ-ZNF652表达量均显著高于正常卵巢细胞系($P < 0.01$); 与Control组比较, si-circ-ZNF652组细胞活力降低($P < 0.01$)、细胞迁移能力显著降低($P < 0.01$), Akt和GSK-3 β 蛋白表达不变($P > 0.05$), 而磷酸化Akt和磷酸化GSK-3 β 蛋白显著降低($P < 0.01$)。Si-control组与Control组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 环状非编码RNA circ-ZNF652在卵巢癌细胞系中高表达, 沉默其表达可抑制细胞增殖和迁移, 其机制可能与调控Akt/GSK-3 β 信号通路有关。

[关键词] 卵巢癌; 环状非编码RNA circ-ZNF652; 增殖; 迁移

Effect and mechanism of non-coding RNA circ-ZNF652 on proliferation and migration of ovarian cancer cells

WU Wen, LI Dan

(Department of Gynaecology and Obstetrics, West Campus of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of non-coding RNA circ-ZNF652 in ovarian cancer cells, its effect on proliferation and migration of ovarian cancer cells, and the potential mechanism. **Methods:** qPCR was used to detect the expression of non-coding RNA circ-ZNF652 in ovarian cancer cell lines PA-1, Caov-3, Caov-4, SK-OV-3 and normal ovarian cell line HPOSEC and SV40. SK-OV-3 cells were transfected with circ-ZNF652 knockdown plasmid (the si-circ-ZNF652 group) and negative control plasmid (the si-control group), whereas wild type SK-OV-3 cells were used as blank control group (the control group). CCK-8 assay and wound healing assay were used to detect the cell viability and migration ability. The expression of phosphorylation of Akt and GSK-3 β was measured by Western blot. **Results:** The expressions of circ-ZNF652 in the ovarian cancer cell lines were significantly higher than that in the normal ovarian cell line ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, cells in the si-circ-

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-17

通信作者 (Corresponding author): 李丹, Email: lidanuh@sina.com

ZNF652 group cells have a lower cell viability ($P<0.01$), cell migration was significantly decreased ($P<0.01$), and phosphorylation of Akt and GSK-3 β were significantly suppressed ($P<0.01$). There was no significant difference between the si-control group and the control group ($P>0.05$). **Conclusion:** The expression of circ-ZNF652 is increased in ovarian cancer cells. The increase of its expression enhances the proliferation and migration of ovarian cancer cells, and may associate with the regulation of Akt/GSK-3 β signaling pathway.

Keywords ovarian cancer; circ-ZNF652; proliferation; migration

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中最致命的一种。2018年, 美国卵巢癌确诊死亡人数为14 070例, 新发卵巢癌病例为22 240例。1985至2014年卵巢癌的总发病率下降, 且1976至2015年其病死率也表现出稳定的下降趋势^[1]。然而, 中国的卵巢癌发病及病死率情况则不同, 卵巢癌是导致女性癌症死亡的第5大原因, 5年总生存率仅约46.5%。卵巢癌转移机制复杂, 且预后不良。卵巢癌患者多盆腔和腹膜器官转移多因为脱落的肿瘤细胞在发病早期通过腹腔液向外扩散, 形成跨腹腔转移^[2]。环状RNA是一种特殊的非编码RNA, 在肿瘤形成与发展过程中发挥重要作用。最新发现的一种环状非编码RNA circ-ZNF652(hsa_circ_0003258)被证实存在于一些肿瘤细胞中表达异常, 且能影响肝癌细胞的增殖和转移^[3-4]。Circ-ZNF652基因位点存在于人10号染色体上。然而, 尚无文献报道circ-ZNF652在卵巢癌细胞系中的表达及功能。本研究旨在研究circ-ZNF652在卵巢癌细胞系中的表达及其对细胞增殖和迁移的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用卵巢癌细胞系PA-1(ATCC[®] CRL-1572[™]), Caov-3(ATCC HTB-75), Caov-4(ATCC HTB-76), SK-OV-3(ATCC HTB-79)均购自美国ATCC公司; 人类原代正常卵巢表皮细胞(human primary ovarian surface epithelial cells, HPOSEC)及人正常卵巢上皮细胞系SV40均购自加拿大Applied Biological Materials公司, 检测所需的磷酸化蛋白激酶B(phospho protein kinase B, Akt; p-Akt), Akt, 磷酸化GSK-3 β (phospho-Glycogen synthase kinase-3, p-GSK-3 β), GSK-3 β 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗及羊抗兔二抗购自美国Abcam公司; D-MEM细胞培养基以及胎牛血清均购自美国Gibco公司; 转染试剂盒Lipofectamine[™] 3000

Transfection Reagent购自美国Thermo Fisher公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

SK-OV-3细胞培养于37 °C, 5% CO₂标准无菌细胞培养箱, 细胞均使用含有10%胎牛血清的D-MEM细胞培养基, 每周消化传代2次。使用siRNA进行circ-RNA的基因敲降处理^[4]。siRNA稀释至终浓度60 nmol/L用于转染, 取对数期SK-OV-3细胞分成3组, 根据试剂盒说明书在37 °C使用Lipofectamine[™] 3000转染48 h, 3组分别使用circ-ZNF652 siRNA转染的沉默组(si-circ-ZNF652组)、使用NC siRNA转录的阴性对照组(si-control组)及未转录的空白对照组(control组)。转染序列由BLOCK-iT[™] RNAi Designer设计合成, circ-ZNF652 siRNA序列为5'-TGTGACTGTTCTCTCAGCTTCATCA-3'; scramble siRNA(siN05815122147)作为NC siRNA。

1.2.2 qPCR 检测

以qPCR法测定RNA表达量^[5]。使用QIAGEN公司的RNeasy Mini Kit提取各组细胞总 miRNAs, 使用Bio-Red RT-qPCR仪检测各组样品及GAPDH内参, 反应条件为95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 共35个循环, 获取各组样品Ct值, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算环状非编码RNA circ-ZNF652的相对表达量。Circ-ZNF652正向引物序列为5'-GGGCACAAACAGTTCATGTG-3', 反向引物序列为5'-TGCGTTTGAATGATTTTCCA-3'; GAPDH正向引物序为: 5'-ACCCAGA-AGACTGTGGATGG-3', 反向引物序列为5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'。

1.2.3 细胞活力检测

使用CCK-8法测定各组细胞增殖能力^[6], 使用96孔板培养细胞, 细胞数目为2 \times 10³个/孔, 培养48 h后分别加入10 μ L CCK-8溶液, 用DNM-9606酶标仪检测各组的490 nm处的OD值, 实验重复3次, 每次8个复孔。计算相对细胞活力, 相对细胞活力=OD_{490 nm}(实验组)/OD_{490 nm}(对照组)。

1.2.4 细胞迁移检测

以细胞划痕实验检测细胞迁移能力^[6]。各组细胞使用6孔板培养, 细胞数目为 2×10^5 个/孔, 培养12 h后, 使用200 mL移液枪头在培养板中央均匀划线, 在倒置显微镜下拍照记录划痕宽度, 使用无血清培养基培养24 h后在倒置显微镜下再次拍照记录划痕宽度, 计算宽度变化, 即为细胞迁移距离。实验重复3次, 每次3个复孔。相对细胞迁移值计算公式: $\text{相对细胞迁移值} = (\text{0 h宽度}_{\text{实验组}} - \text{24 h宽度}_{\text{实验组}}) / (\text{0 h宽度}_{\text{对照组}} - \text{24 h宽度}_{\text{对照组}})$ 。

1.2.5 蛋白质印迹法检测

以蛋白质印迹法检测蛋白表达^[7]。各组细胞培养48 h后, 裂解提取各组细胞总蛋白, 将Akt和GSK-3 β 磷酸化蛋白加入磷酸化抑制剂后提取磷酸化蛋白, BCA法测定总蛋白含量。蛋白质印迹法电泳条件: 浓缩胶80 V 60 min, 分离胶100 V 90 min, 使用半干法转膜, 一抗浓度1:200, 二抗浓度1:500, 发光液显影后使用胶片曝光, 扫描仪导入胶片图片后使用Quantity One软件分析蛋白灰度值, 实验重复3次。先将各蛋白相对表达量对GAPDH进行标准化后再比较。

1.3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验或ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Circ-ZNF652 在正常卵巢上皮细胞系及卵巢癌细胞系中的表达

qPCR结果显示: 在人类原代正常卵巢表皮细胞HPOSEC、人类正常卵巢上皮细胞系SV40和卵巢癌细胞系PA-1, Caov-3, Caov-4, SK-OV-3中, circ-ZNF652相对表达量分别为 1.00 ± 0.18 , 1.22 ± 1.81 , 8.76 ± 0.93 , 8.14 ± 0.66 , 6.66 ± 0.53 , 9.13 ± 1.36 ; 卵巢癌细胞系PA-1, Caov-3, Caov-4及SK-OV-3中circ-ZNF652相对表达量均显著高于正常卵巢上皮细胞系HPOSEC及SV40($P < 0.05$, 图1)。

2.2 Circ-ZNF652 敲降效率检测

转染24 h后, qPCR结果显示: si-circ-ZNF652组的circ-ZNF652相对表达量显著低于si-control组(0.23 ± 0.18 vs 1.00 ± 0.44 , $P < 0.01$); 而si-control组的circ-ZNF652相对表达量与Control组差异无统计学意义(1.04 ± 0.48 vs 1.00 ± 0.34 , $P > 0.05$; 图2)。

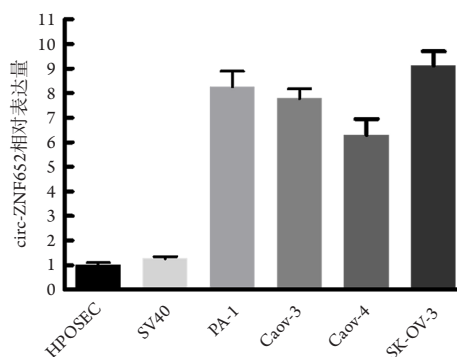


图1 circ-ZNF652在正常卵巢细胞及卵巢癌细胞中的相对表达量

Figure 1 Normalized expressions of circ-ZNF652 in normal ovarian and ovarian cancer cells

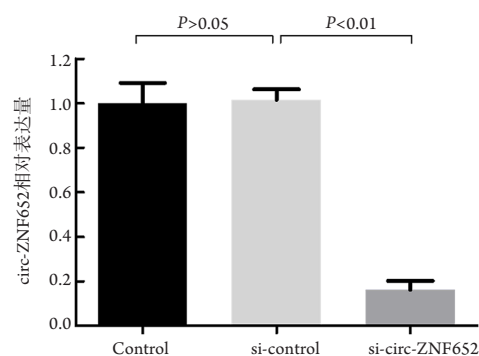


图2 敲降后SK-OV-3各组circ-ZNF652相对表达量比较

Figure 2 Normalized circ-ZNF652 expressions after knockdown

2.3 非编码 RNA circ-ZNF652 敲降对细胞增殖的影响

CCK-8结果显示: 培养48 h后, Control组、si-control组和si-circ-ZNF652组相对细胞活力分别为 1.00 ± 0.59 , 1.17 ± 0.40 , 0.56 ± 0.32 , si-circ-ZNF652组相对细胞活力显著低于si-control组($P < 0.01$), si-control组与Control组差异无统计学意义($P > 0.05$, 图3)。

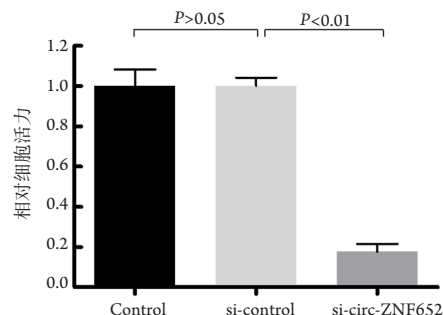


图3 敲降circ-ZNF652对SK-OV-3细胞相对活力影响

Figure 3 Effect of circ-ZNF652 knockdown on SK-OV-3 cell viability

2.4 Circ-ZNF652 敲降对肿瘤细胞迁移的影响

划痕实验结果示：在敲降后，Control组、si-control组和si-circ-ZNF652组相对迁移值分别为 1.00 ± 0.25 ， 1.06 ± 0.23 ， 0.18 ± 0.29 ，si-circ-ZNF652组相对迁移值显著低于si-control组($P < 0.01$)，si-control组与Control组差异无统计学意义($P > 0.05$)，图4)。

2.5 Circ-ZNF652 敲降对 Akt 和 GSK-3 β 磷酸化的影响

蛋白质印迹法示：circ-ZNF652敲降后，基础总Akt蛋白和GSK-3 β 蛋白表达均没有明显变化($P > 0.05$)，而磷酸化Akt蛋白和GSK-3 β 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$)。Si-control组与Control组各蛋白相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)，图5)。

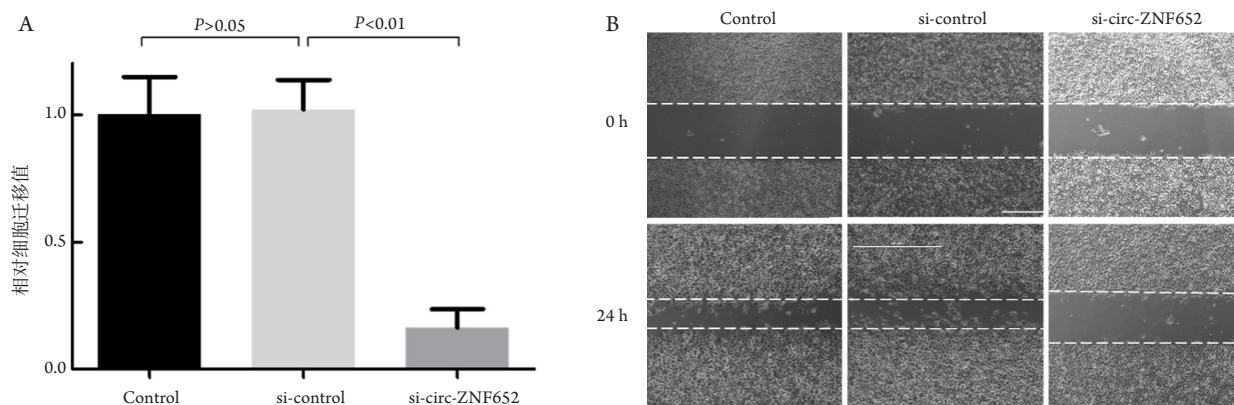


图4 敲降circ-ZNF652对SK-OV-3细胞迁移的影响(A)及细胞划痕图(B, $\times 100$)

Figure 4 Effect of circ-ZNF652 knockdown on SK-OV-3 cell migration (A) and representative images of migration assay (B, $\times 100$)

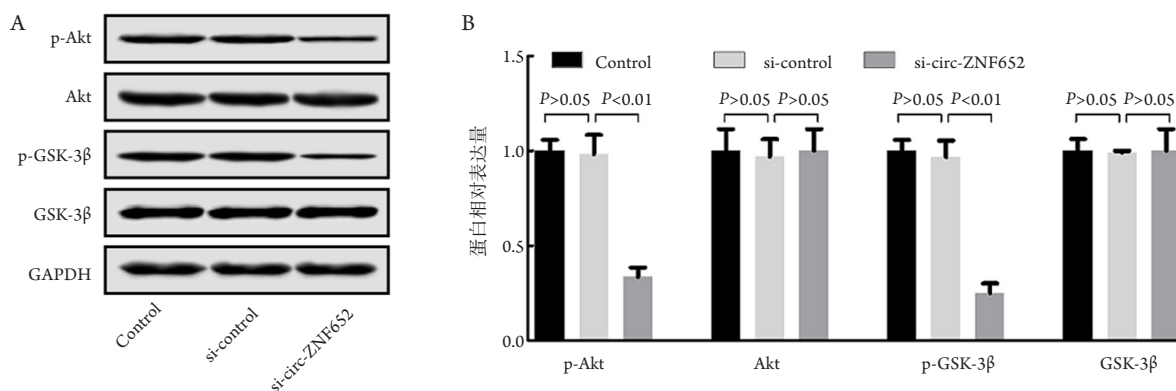


图5 敲降circ-ZNF652对SK-OV-3的Akt和GSK-3 β 磷酸化的影响

Figure 5 Effect of circ-ZNF652 knockdown on the phosphorylation of Akt and GSK-3 β in SK-OV-3 cells

3 讨论

卵巢癌是一种病死率极高的女性生殖系统癌症，目前治疗方法非常有限，治疗效果不理想^[8]。绝大多数原发性卵巢癌属于卵巢上皮癌变^[9]。近70%患者由于缺乏有效的筛查方法，在中期或晚期才被诊断出患有卵巢癌^[10]，导致卵巢癌患者的5年生存率相对较低^[11]。因此，卵巢癌的发病机制及潜在治疗靶点的研究对于卵巢癌的早期

诊断和临床治疗有重大意义。

非编码RNA是一种不能编码蛋白质的RNA，能通过调控基因的转录和转录后蛋白质翻译影响细胞代谢以及增殖等一系列生物学过程。研究^[12]表明：许多非编码RNA的异常表达与肿瘤发展、细胞癌变紧密相关。非编码小分子RNA通常可以通过结合靶基因mRNA中3'-UTR序列，降解或抑制靶mRNA的翻译过程，从而调节基因表达^[13]。作为一类特殊的非编码RNA，很多环状RNA在肿瘤

发展中起重要作用。最近, 一种环状非编码RNA circ-ZNF652(hsa_circ_0003258)被证实 在肝肿瘤细胞中异常高表达, 并能显著增强肝癌细胞的增殖率和转移迁移能力^[3]。

Circ-ZNF652基因位于人类10号染色体, 其位点在人锌指蛋白652基因上^[14]。最早于肝癌的研究中发现Circ-ZNF652与肿瘤发展相关。Guo等^[3]使用GEO数据库发现了一种新的circRNA, 将其命名为circ-ZNF652(hsa_circ_0003258), 发现其在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达显著上调。本研究通过比较circ-ZNF652在多种卵巢癌细胞系和正常卵巢上皮细胞系包括原代卵巢上皮细胞以及无限增殖的卵巢癌上皮细胞系内的表达, 发现circ-ZNF652的表达量在卵巢癌细胞中表达显著高于正常卵巢细胞, 该结果与肝癌细胞的研究^[3]结果一致, 提示circ-ZNF652可能在卵巢癌中发挥促癌的功能。

研究^[3]表明: 筛查出现circ-ZNF652异常高表达肝癌患者更容易发生癌细胞血管侵犯、肝内转移、肝外转移等不良后果。Circ-ZNF652的表达减少可以通过抑制干细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程, 显著抑制体内肝癌的转移。离体实验^[3]证明: 肝癌细胞的迁移和侵袭能力与circ-ZNF652的表达密切相关。本研究发现: 恶性卵巢癌细胞系SK-OV-3在敲降circ-ZNF652后, 其增殖及迁移能力显著下降。Circ-ZNF652与恶性卵巢癌细胞系SK-OV-3的增殖和迁移的促进有关, 提示circ-ZNF652在该细胞中的高表达可能是其无限增殖并且存在浸润性的原因之一。本研究发现circ-ZNF652的敲降能降低卵巢癌细胞的细胞活力。

Circ-ZNF652表达影响肿瘤发展的机制与转录因子Snail的表达有关^[3], circ-ZNF652可以与miR-203和miR-502-5p共同作用以促进Snail基因的表达。Snail作为促进EMT表达的的关键转录因子, 能显著促进肝癌转移。同时, 上调的Snail还可以通过结合circ-ZNF652启动子上的E-box基序(CAGGTG)以正反馈调节circ-ZNF652的表达^[3]。卵巢癌的发病与Akt/GSK-3 β /Snail信号通路密切相关^[15]。为进一步探究circ-ZNF652在卵巢癌的发病与Akt/GSK-3 β /Snail信号通路中的作用, 本研究运用蛋白质印迹法结合基因敲降技术, 检测卵巢癌细胞系SK-OV-3中Akt和GSK-3 β 蛋白的表达变化以及Akt和GSK-3 β 蛋白磷酸化的变化。研究^[16]发现: 诸多非编码RNA通过介导Akt/GSK-3 β /Snail信号通路, 从而影响卵巢癌的转移。Golding等^[17]发现: 在恶

性神经胶质瘤细胞中, Akt信号通路可介导肿瘤细胞迁移。在本研究中, circ-ZNF652敲降后, 卵巢癌细胞迁移能力显著下降, 进一步研究发现Akt蛋白表达未受影响, 但Akt磷酸化蛋白显著降低, 表明circ-ZNF652通过降低Akt磷酸化来抑制卵巢细胞迁移。另一方面, GSK-3 β 是AKT信号通路中的下游基因, 可导致Snail转录因子的磷酸化, 从而调节EMT并参与肿瘤侵袭和转移^[18-20]。通过蛋白质印迹法, 我们发现circ-ZNF652敲降后, p-Akt, p-GSK-3 β 的表达水平均显著下降, 表明circ-ZNF652可以通过介导Akt/GSK-3 β 信号调节卵巢癌的Snail信号通路, 从而影响卵巢癌细胞的迁移。

本研究尚存在不足之处: 体外环境与体内微环境有一定的差异, 体外实验只能部分反映肿瘤细胞在体内的活动, circ-ZNF652在卵巢癌中的作用需要在更多的细胞系和动物模型中进行进一步研究。此外, circ-ZNF652与Akt/GSK-3 β 信号通路调控机制复杂, 所涉及的更多上下游靶点都需要进一步发掘和研究。

综上, circ-ZNF652在卵巢癌细胞系中表达上调, 沉默circ-ZNF652可抑制卵巢癌细胞系SK-OV-3的增殖及迁移, 其机制可能与Akt/GSK-3 β 信号通路调控有关。

参考文献

1. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-296.
2. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2013, 24(Suppl 6): vi24-vi32.
3. 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[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(4): 812-819.
4. Wang YG, Wang T, Ding M, et al. hsa_circ_0091570 acts as a ceRNA to suppress hepatocellular cancer progression by sponging hsa-miR-1307[J]. Cancer Lett, 2019, 460: 128-138.
5. Liu X, Liu H, Xiong Y, et al. Postmenopausal osteoporosis is associated with the regulation of SP, CGRP, VIP, and NPY[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 742-750.
6. Li R, Xiao C, Liu H, et al. Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 666.
7. Liu H, Xiong Y, Wang H, et al. Effects of water extract from epimedium

- on neuropeptide signaling in an ovariectomized osteoporosis rat model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 126-136.
8. Agostini A, Panagopoulos I, Davidson B, et al. A novel truncated form of HMGA2 in tumors of the ovaries[J]. *Oncology letters*, 2016, 12(2): 1559-1563.
 9. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features[J]. *Virchows Archiv*, 2012, 460(3): 237-249.
 10. Ni X, Zhang W, Huang KC, et al. Characterisation of human kallikrein 6/protease M expression in ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(4): 725-731.
 11. Teng Z, Han R, Huang X, et al. Increase of incidence and mortality of ovarian cancer during 2003–2012 in Jiangsu Province, China[J]. *Front Public Health*, 2016, 4: 146.
 12. Peng WX, Koirala P, Mo YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667.
 13. Pei Y, Wang X, Zhang X. Predicting the fate of microRNA target genes based on sequence features[J]. *J Theor Biol*, 2009, 261(1): 17-22.
 14. Mohajeri K, Cantsilieris S, Huddleston J, et al. Interchromosomal core duplicons drive both evolutionary instability and disease susceptibility of the Chromosome 8p23. 1 region[J]. *Genome Res*, 2016, 26(11): 1453-1467.
 15. Liu HY, Zhang YY, Zhu BL, et al. MiR-203a-3p regulates the biological behaviors of ovarian cancer cells through mediating the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway by targeting ATM[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 60.
 16. Yin S, Wang P, Yang L, et al. Wip1 suppresses ovarian cancer metastasis through the ATM/AKT/Snail mediated signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29359.
 17. Golding SE, Rosenberg E, Valerie N, et al. Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(10): 2894-2902.
 18. Lu L L, Chen X H, Zhang G, et al. CCL21 facilitates chemoresistance and cancer stem cell-like properties of colorectal cancer cells through AKT/GSK-3 β /Snail signals[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5874127.
 19. Wang S, Wang X, Li J, et al. c-Met, CREB1 and EGFR are involved in miR-493-5p inhibition of EMT via AKT/GSK-3 β /Snail signaling in prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82303.
 20. Lan Y, Han J, Wang Y, et al. STK17B promotes carcinogenesis and metastasis via AKT/GSK-3 β /Snail signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 236.

本文引用：吴文, 李丹. 环状非编码RNA circ-ZNF652对卵巢癌增殖和迁移的影响及机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(9): 2225-2230. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.001

Cite this article as: WU Wen, LI Dan. Effect and mechanism of non-coding RNA circ-ZNF652 on proliferation and migration of ovarian cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(9): 2225-2230. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.001