

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.002>

Circ_0000218 通过调节 miR-139-3p/SOX2 分子轴 促进肾癌发展

林其玲, 陈畅

(宜昌市第一人民医院, 三峡大学人民医院肾内科, 湖北 宜昌 443000)

[摘要] 目的: 探究环状RNA(circRNA)0000218(circ_0000218)/miR-139-3p/SRY盒转录因子2(SOX2)分子轴在调节肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)细胞增殖和转移的作用及其机制。方法: 采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肾癌组织和细胞中circ_0000218和miR-139-3p的表达水平, 以及肾癌细胞中二者的调控关系, 并对43例肾癌患者组织中circ_0000218和miR-139-3p的表达水平进行相关性分析。采用CCK-8和Transwell实验分别检测过表达circ_0000218或miR-139-3p模拟物在细胞中增殖和迁移侵袭的作用。采用StarBase数据库预测miR-139-3p在肾癌样本中的表达与其生存预后信息。采用蛋白质印迹法检测肾癌细胞中circ_0000218或miR-139-3p对SOX2表达水平的影响。最后采用CircInteractome和TargetScan预测, 双荧光素酶报告基因实验验证circ_0000218与miR-139-3p, miR-139-3p和SOX2之间的靶向关系。结果: Circ_0000218在肾癌患者癌组织以及细胞系中均显著上调, 同时其高表达水平和T分期级别增加, 局部淋巴结转移和远处转移显著相关。过表达circ_0000218促进肾癌细胞增殖和转移。而miR-139-3p在肾癌组织和细胞中低表达, 且StarBase数据库预测其低表达与肾癌患者生存期呈正相关。Circ_0000218与miR-139-3p表达呈负相关, 潜在的机制表明circ_0000218通过调节miR-139-3p/SOX2轴促进肾癌增殖和转移。结论: 在RCC中, circ_0000218通过调节miR-139-3p/SOX2轴促进RCC细胞的增殖和转移, 并有可能作为诊断性生物标志物和治疗靶点。

[关键词] 肾细胞癌; 环状RNA 0000218; miR-139-3p; SRY盒转录因子2

Circ_0000218 promoting the progression of renal cell carcinoma by regulating the molecular axis of miR-139-3p/SOX2

LIN Qiling, CHEN Chang

(Department of Nephrology, First People's Hospital of Yichang, People's Hospital of Three Gorges University, Yichang Hubei 443000, China)

Abstract **Objective:** To explore the mechanism of circRNA (circ_0000218)/miR-139-3p/SRY-box transcription factor 2

收稿日期 (Date of reception): 2019-09-24

通信作者 (Corresponding author): 陈畅, Email: jinglicai3@163.com

基金项目 (Foundation item): 三峡大学重点教学研究项目 (J2017056)。This work was supported by the Major Teaching Research Project of China Three Gorges University, China (J2017056).

(SOX2) axis in mediating the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma cells. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of circ_0000218 and miR-139-3p in renal cell carcinoma tissues and cells, as well as the regulatory relationship between circ_0000218 and miR-139-3p in renal cancer cells. Subsequently, CCK-8 and Transwell experiments were used to detect the role of over expressed circ_0000218 or miR-139-3p mimics in cell proliferation, migration and invasion. The expression of miR-139-3p in RCC samples and its survival and prognosis information were predicted by StarBase database. Furthermore, Western blot was used to detect the effect of circ_0000218 or miR-139-3p on the expression of SOX2 in RCC cells. Finally, we use CircInteractome and TargetScan to predict, the double luciferase reporter gene experiment was verified the target relationship between circ_0000218 and miR-139-3p, miR-139-3p and SOX2. **Results:** Circ_0000218 was significantly up-regulated in renal cell carcinoma tissues and cell lines, and its high expression level was significantly correlated with T stage increased, local lymph node metastasis and distant metastasis. Overexpression of circ_0000218 promotes the proliferation and metastasis of RCC cells. The expression of miR-139-3p was low in renal cancer tissues and cells, and StarBase database predicted that its low expression was positively correlated with survival time of renal cancer patients. There is a negative correlation between circ_0000218 and miR-139-3p expression. The underlying mechanism suggests that circ_0000218 can promote the proliferation and metastasis of RCC by regulating miR-139-3p/SOX2 axis. **Conclusion:** In renal cell carcinoma, the circ_0000218 promotes the proliferation and metastasis of RCC cells by targeting on miR-139-3p/SOX2 axis, and may be used as a diagnostic bio-marker and therapeutic target.

Keywords renal cell carcinoma; circ_0000218; miR-139-3p; SRY-box transcription factor 2

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)起源于肾皮质, 是最常见的泌尿系统肿瘤之一, 而且肾癌缺乏早期临床特征, 全世界因RCC死亡的病例约为134 000例^[1]。由于肾癌对放化疗具有抵抗性, 手术切除仍然是首选治疗方法, 但是肾切除后, 仍有近30%的患者会出现复发和转移^[2]。因此, 寻找早期诊断的生物标志物和治疗靶点具有重要意义。

在非编码RNAs的大家族中, 环状RNA(circular RNA, circRNA)是一种新型的分子, 主要来源于pre-mRNAs^[3]。CircRNA是一种单链RNA, 可形成共价闭合的连续环, 因此具有序列保守、结构稳定、丰度高和特异性高的特性^[4]。CircRNA的异常表达与包括RCC在内的人体多种恶性肿瘤密切相关, 例如circ_000926促进肾癌细胞的生长、迁移、侵袭和内皮间质转化^[5]。此外, 在肾癌中, circ_0039569促进细胞的生长和转移^[6]。然而, circ_0000218在肾癌中的作用和调控机制尚不清楚。

微RNA(microRNA, miR)是一类短的非编码RNA, 长度为18~25个核苷酸。MiRNA与靶基因mRNA的3'非翻译区的互补结合并调控后者的表达。MiRNA是许多重要细胞过程的关键调节因子, 它们的失调导致蛋白质过度表达或表达不足, 并最终引起引起癌症在内的诸多严重疾病^[7]。

研究^[8]表明: miR-221-5p在肾癌组织和细胞中上调且促进肾癌细胞增殖、迁移并抑制凋亡; Kaplan-Meier显示miR-221-5p高表达的患者预后不良。然而, MiR-30a-3p在RCC中起抑制作用^[9]。MiR-139-3p诱导宫颈癌细胞凋亡且抑制细胞转移^[10]。但miR-139-3p在肾癌中的作用及其调控机制尚未完全阐明。

近年来, 实验^[6]表明: circRNA可吸附miRNA, 而miRNA靶向调控mRNA, 此circRNA-miRNA-mRNA调控网络在癌症进展中发挥关键调节作用, 如circ_0039569调节miR-34a-5p/CCL22促进RCC的生长和转移。而作为circ_0000218的下游靶点, miR-139-3p对多种肿瘤有明确的抑制作用, 且通过circ结合位点预测网站CircInteractome, 我们发现circ_0000218与miR-139-3p存在结合位点, 因此我们选择circ_0000218作为研究对象, 从而探讨circ_0000218/miR-139-3p/SOX2分子轴在肾癌细胞中的作用及其作用机制, 以期为肾癌提供新的治疗靶点。

1 对象与方法

1.1 组织标本

患者均签署知情同意书。本研究得到宜昌市

第一人民医院医学伦理委员会批准并在其指导下进行。纳入于2017年4月至2019年4月在宜昌市第一人民医院初次经病理诊断为肾癌的43例患者, 收集其肾癌组织及邻近的正常肾上皮组织后立即冷冻在液氮中。患者均未接受新辅助治疗。

1.2 主要试剂

肾癌细胞系ACHM, A498和G401以及肾上皮正常细胞HK-2均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。Dulbecco改良的DMEM培养基、10%胎牛血清(FBS)、RNA反转录试剂盒购于Thermo Fisher Scientific(中国)公司, SYBR Green qPCR Master Mix购自美国MedChemExpress公司。青霉素、链霉素和CCK-8溶液购于上海翊圣生物科技有限公司。胰蛋白酶、RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒和ECL显影试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司。一抗anti-SOX2抗体(ab92494, 1:500)和二抗山羊抗兔抗体(ab150077, 1:500)均购于英国Abcam公司。荧光素酶报告载体(circ_0000218-wt, circ_0000218-mt, SOX2-wt, SOX2-mt)购自美国Promega公司。

1.3 细胞培养与转染

所有细胞在Dulbecco改良的DMEM培养基中培养, 并补充10%热灭活的FBS和100 U/mL青霉素、100 µg/mL链霉素。在37 °C, 含有5%CO₂的培养箱中培养。用0.25%胰蛋白酶进行传代培养。本研究的所有实验选用处于指数生长期的细胞。每2 d更换1次细胞培养液。将细胞以2×10⁴个/孔的密度接种于6孔板中, 培养24 h后, 利用Lipofectamine™ 2000转染HK-2, ACHM, A498和G401细胞。

1.4 qRT-PCR

使用TRIzol试剂提取组织和细胞中的总RNA, 用紫外分光光度计检测RNA浓度后, 用反转录试剂盒转录成cDNA, 取1 µL的cDNA样本, 扩增至50 µL, 采用SYBR Green Premix Ex Taq II进行qRT-PCR, 使用2^{-ΔΔCT}方法计算circ_0000218和miR-139-3p相对表达量。U6为内参, 引物序列见表1。

1.5 CCK-8 法

用CCK-8法检测阴性对照组NC, circ_0000218和miR-139-3p转染A498细胞后细胞活力的改变。将A498细胞以2×10³个/孔的密度接种于96

孔板中, 在37 °C, 5%CO₂并加湿的条件下培养48 h。每孔加入10 µL CCK-8试剂, 在37 °C环境中孵育1 h, 在450 nm处测定吸光度值, 此后在第24, 48, 72 h各测定1次细胞的吸光度值, 每个实验重复3次, 每次测量3次。

1.6 Transwell 实验

采用Transwell实验测定细胞的迁移和侵袭能力。在迁移实验中, 取对数生长期的肾癌细胞, 使用胰酶消化后, 收集A498细胞, 并用不含血清的培养基重悬, 将200 µL单细胞悬液接种在装有Transwell小室的12孔板中, 12孔板内每孔加入1 mL完全培养基。之后将12孔板继续置于培养箱内培养。24 h后, 用棉签轻轻地拭去Transwell小室上表面的细胞, 侵入下室的细胞采用95%乙醇固定20 min, 然后用0.1%结晶紫染色10 min, 于显微镜下取5个视野下的细胞株拍照计数。在侵袭实验中, 除Transwell小室底层覆有1层基质胶外, 其余步骤同迁移实验。各组细胞实验重复3次。

1.7 蛋白质印迹法

用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞, 高速离心后收集上清, 采用BCA蛋白质含量检测试剂盒测量各组蛋白质浓度, 将上清在水浴锅中于100 °C加热10 min使蛋白质变性。将总蛋白质进行SDS-PAGE凝胶电泳, 然后电转至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉将膜封闭1 h后, 加入一抗于4 °C条件下孵育过夜, 随后用PBST洗膜5次, 再加入二抗于室温孵育1 h, 最后使用超敏ECL化学发光、显影。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列(5'-3')
circ_0000218	正向: TGGAGTGCAGCTGAAGGTTTAT
	反向: TTCAGAGCCAAAGCGGGAGA
miR-139-3p	正向: GGAGACGGGCCCTGTTGGAGT
	反向: Uni-miR qPCR primer
U6	正向: CTCGCTTCGRCAGCACA
	反向: AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.8 双荧光素酶报告基因实验

将A498细胞以 4.5×10^4 个/孔的密度接种于48孔板中, 培养至70%融合。然后用脂质体2000将circ_0000218-wt, circ_0000218-mt, SOX2-wt, SOX2-mt与miR-139-3p mimics或阴性对照物共转染A498细胞, 转染48 h后, 按照试剂盒说明书测定荧光素酶活性。所有实验重复3次。

1.9 统计学处理

采用SPSS22.0软件进行统计学分析, 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料两组之间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Circ_0000218 在肾癌组织和细胞中高表达及其高表达与肾癌患者临床病理指标相关性

qRT-PCR检测43例肾癌患者中癌组织和正常癌旁组织中circ_0000218的表达水平, 结果显示: 与正常癌旁组织相比, circ_0000218在肾癌组织中显著高表达(图1A); 此外, 与正常肾上皮细胞相比, circ_0000218在肾癌细胞中均显著高表达(图1B)。且其高水平表达和T分期级别增加, 局部淋巴结转移和远处转移显著相关(表2), 表明circ_0000218可能与肾癌的发生有关。

2.2 过表达 circ_0000218 显著促进肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭

qRT-PCR结果显示: 过表达circ_0000218可稳定上调A498细胞中circ_0000218的表达水平(图2A)。CCK-8法结果显示: 过表达circ_0000218

显著促进A498细胞的增殖(图2B)。Transwell实验显示: 过表达circ_0000218显著促进A498细胞的迁移和侵袭(图2C, 2D)。表明过表达circ_0000218可显著促进A498细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.3 Circ_0000218 靶向调控并负调节 miR-139-3p 的表达

使用CircInteractome网站(<https://circinteractome.nia.nih.gov/>)预测miR-139-3p可能是circ_0000218的靶基因(图3A)。双荧光素酶报告基因实验证实转染miR-139-3p mimics可显著抑制野生型circ_0000218的荧光素酶活性, 而对于突变型circ_0000218没有显著作用(图3B)。随后, 采用qRT-PCR分别检测43例患者的circ_0000218与miR-139-3p的表达水平, 发现二者具有显著相关性(图3C); 此外, 在A498细胞中过表达circ_0000218显著抑制miR-139-3p的表达水平(图3D)。表明circ_0000218直接靶向负调控miR-139-3p的表达。

2.4 MiR-139-3p 在肾癌组织和细胞中显著低表达及其低表达与患者预后良好相关

进一步使用qRT-PCR检测43例肾癌患者中癌组织和正常癌旁组织中miR-139-3p的表达水平, 结果显示: 相比于癌旁组织, 肾癌中miR-139-3p表达显著下调(图4A); 相比于正常肾上皮细胞, miR-139-3p在肾癌细胞中显著下调(图4B)。Starbase3.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/panCancer.php>)数据库数据显示: 相比于癌旁组织, miR-139-3p在肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)样本中显著低表达(图4C); miR-139-3p的表达水平和总体生存期呈正相关(图4D)。

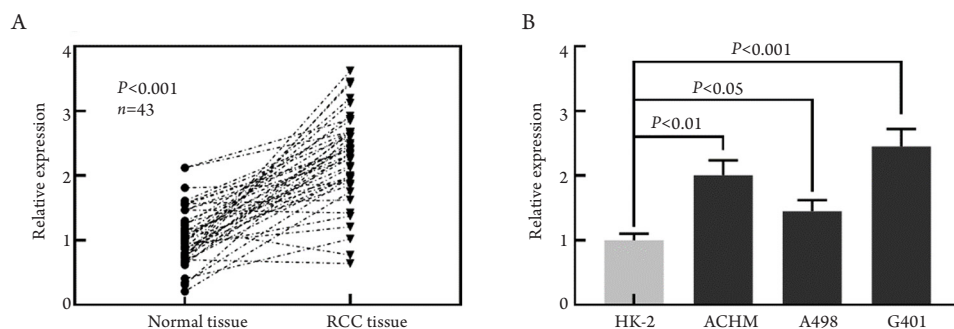


图1 circ_0000218在肾癌组织(A)和细胞(B)的表达水平

Figure 1 Expression of circ_0000218 in RCC tissue (A) and cells (B)

与正常组织或细胞相比, $P < 0.05$ 。

Compared with normal tissues or cells, $P < 0.05$.

表2 Circ_0000218表达水平与临床病理指标相关性

Table 2 Correlation between expression circ_0000218 and clinicopathological parameters in RCC

病理特征	n	Circ_0000218表达水平		χ^2	P
		高表达(n=24)	低表达(n=19)		
年龄/岁				1.7730	0.183
≥ 57	23	15	8		
< 57	20	9	11		
性别				3.5961	0.058
男	25	17	8		
女	18	7	11		
分化程度				2.7940	0.095
高分化	21	9	12		
中、低分化	22	15	7		
T分期				4.7205	0.030
T1+T2	15	5	10		
T3+T4	28	19	9		
淋巴结转移				4.8003	0.028
无	17	6	11		
有	26	18	8		
是否远处转移				6.3444	0.012
是	25	18	7		
否	18	6	12		
肿瘤大小/cm				2.5940	0.108
≥ 4	24	16	8		
< 4	19	8	11		

2.5 MiR-139-3p 模拟物显著抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭

将miR-139-3p mimics转染A498细胞, qRT-PCR结果显示: A498细胞中miR-139-3p表达水平上调(图5A); CCK-8和Transwell实验表明: 相比于miR-NC对照组, 转染miR-139-3p mimics的A498细胞活力(图5B)和迁移侵袭数量(图5C, 5D)显著降低。表明miR-139-3p可抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.6 Circ_0000218 通过 miR-139-3p 促进肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭

已证实circ_0000218可负调控miR-139-3p的表达, 为了进一步探究circ_0000218通过miR-139-3p对肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响, 在转染circ_0000218的基础上进一步转染miR-139-3p, qRT-PCR结果显示成功转染circ_0000218和miR-139-3p mimics(图6A)。通过CCK-8和

Transwell实验, 我们发现: 与NC组相比, 过表达circ_0000218可促进A498细胞活力、迁移和侵袭, 而共转染circ_0000218+miR-139-3p mimics组, 这种效应显著减弱(图6B, 6C)。

2.7 Circ_0000218 通过 miR-139-3p 促进 SOX2 的表达

通过Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/)数据库探究miR-139-3p对其下游蛋白SOX2的调控作用, 发现SOX2是miR-139-3p的潜在靶基因之一(图7A); 双荧光素酶报告基因实验证实转染miR-139-3p mimics可显著抑制野生型SOX2的荧光素酶活性, 而对于突变型SOX2没有显著作用(图7B)。蛋白质印迹法结果显示: 相比于对照组, miR-139-3p可显著抑制SOX2的表达水平(图7C), 而相比于NC组, 过表达circ_0000218可显著促进SOX2的表达(图7D)。提示circ_0000218抑制miR-139-3p促进SOX2的表达。

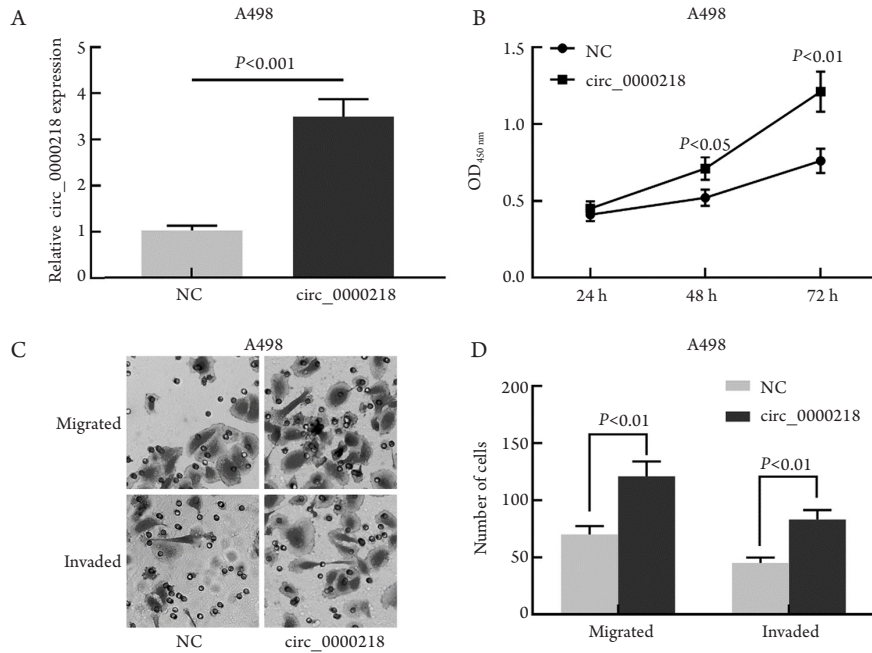


图2 Circ_0000218成功转染A498细胞(A); CCK-8和Transwell实验检测circ_0000218对A498细胞的增殖(B)、迁移(C)和侵袭的作用(D)

Figure 2 A498 cells were successfully transfected by circ_0000218 (A); CCK-8 and transwell experiments were used to detect the effects of circ_0000218 on the proliferation (B), migration (C) and invasion (D) of A498 cells

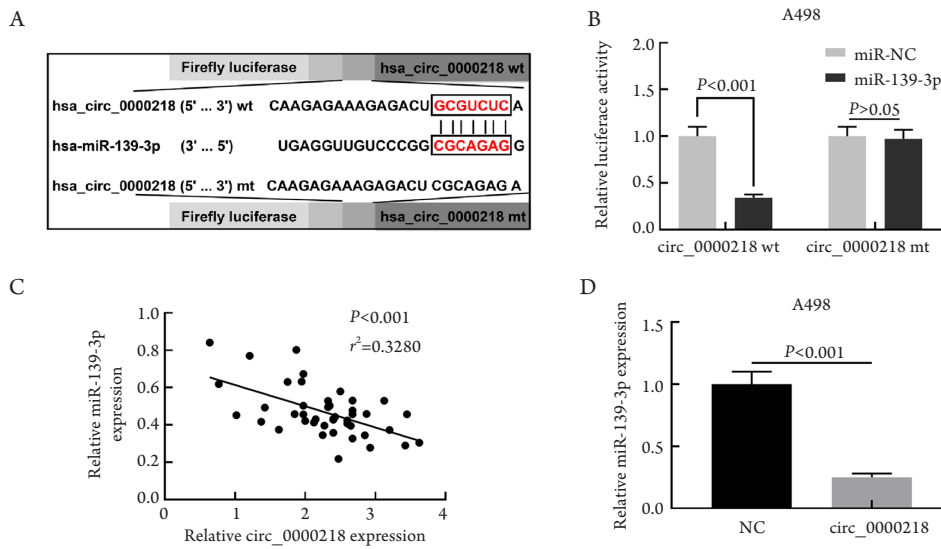


图3 Circ_0000218靶向调控miR-139-3p

Figure 3 Circ_0000218 binds miR-139-3p

(A)Circ_0000218与miR-139-3p结合位点; (B)双荧光素酶报告基因; (C, D)Circ_0000218与miR-139-3p相关性及其调控关系。

(A) Binding site of circ_0000218 and miR-139-3p; (B) Double luciferase reporter gene; (C, D) Correlation between circ_0000218and miR-139-3p and their regulatory relationship.

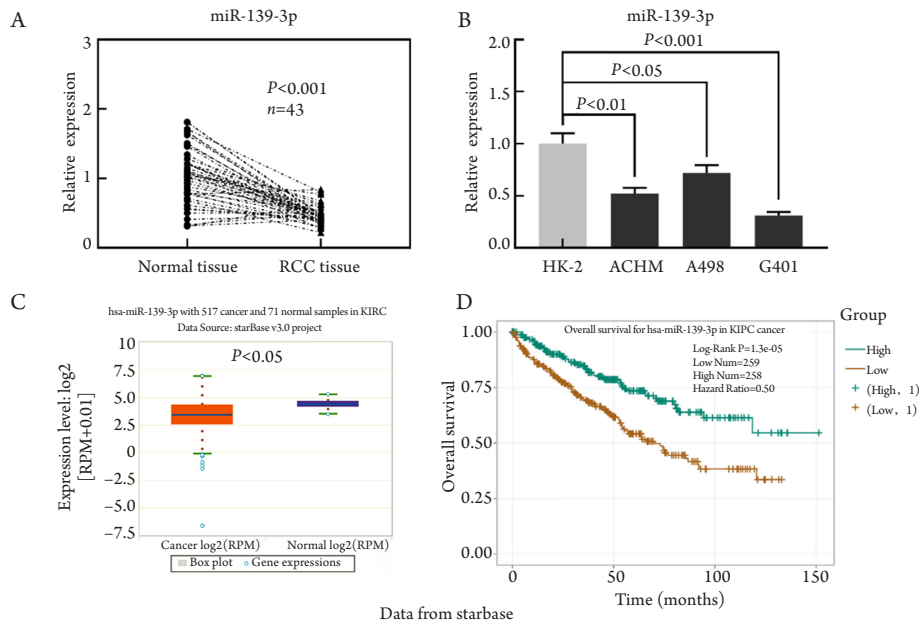


图4 MiR-139-3p在肾癌中的表达及其预后关系

Figure 4 Expression of miR-139-3p in RCC and its relationship with prognosis

MiR-139-3p在肾癌组织(A)和细胞(B)的表达水平; KIRC中miR-139-3p表达差异(C)及其生存曲线(D)。

Expression level of miR-139-3p in RCC tissue (A) and cells (B); Expression difference of miR-139-3p in KIRC (C) and its survival curve (D).

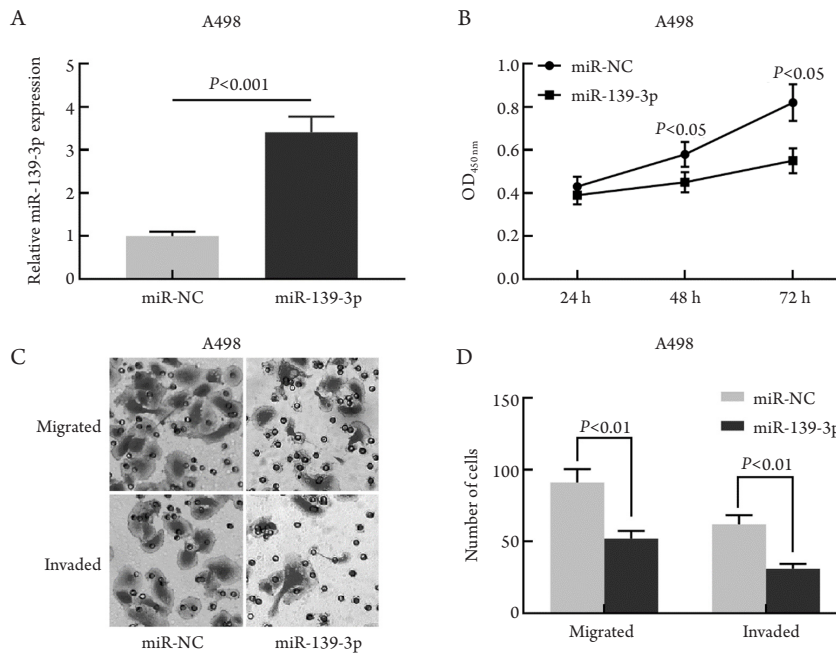


图5 MiR-139-3p成功转染A498细胞(A), CCK-8和Transwell实验显示miR-139-3p显著抑制A498细胞的增殖(B)、迁移(C)和侵袭(D)

Figure 5 MiR-139-3p successfully transfected A498 cells (A); CCK-8 and transwell experiments showed that miR-139-3p significantly inhibited the proliferation (B), migration (C) and invasion (D) of A498 cells

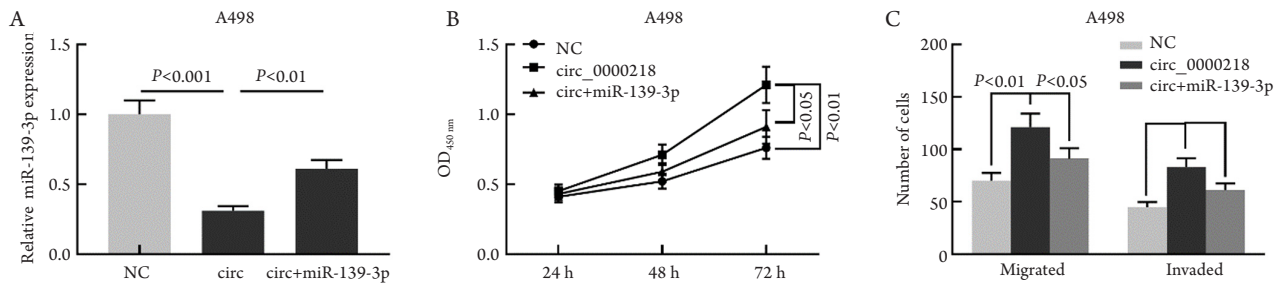


图6 Circ_0000218+miR-139-3p mimics成功转染A498细胞(A); CCK-8和Transwell实验显示circ_0000218+miR-139-3p mimics对A498细胞的增殖(B)、迁移和侵袭(C)的影响

Figure 6 Circ_0000218+miR-139-3p mimics successfully transfected A498 cells (A); CCK-8 and transwell experiments showed the effect of circ_0000218+miR-139-3p mimics on the proliferation (B), migration and invasion (C) of A498 cells

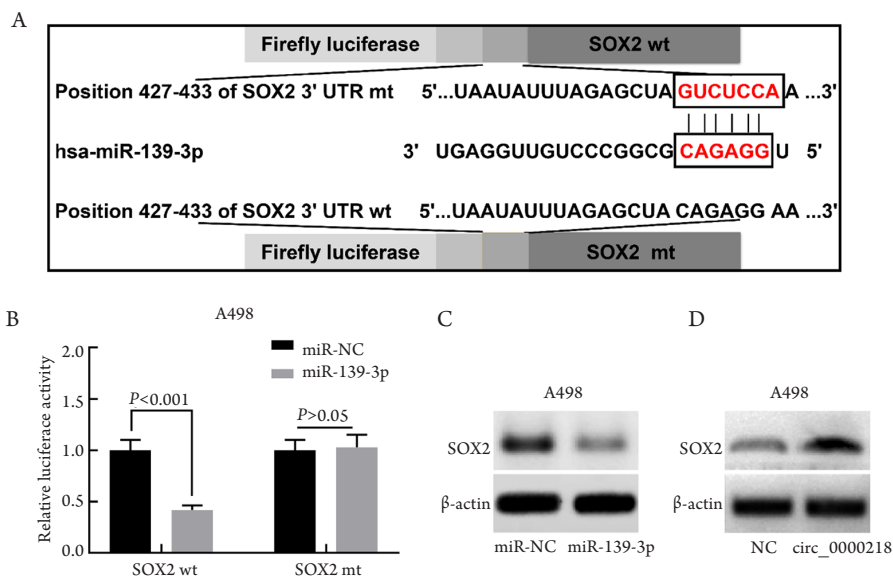


图7 MiR-139-3p靶向结合SOX2

Figure 7 MiR-139-3p targets SOX2

(A) MiR-139-3p与SOX2结合位点; (B) 双荧光素酶报告基因实验; (C) miR-139-3p与SOX2调控作用; (D) circ_0000218与SOX2的调控作用。

(A) MiR-139-3p and SOX2 binding site; (B) Double luciferase reporter gene verification; (C) Regulation function of miR-139-3p and SOX2; (D) Regulation function of circ_0000218 and SOX2.

3 讨论

研究^[11]表明: circRNA在肾癌中异常表达, 作为肿瘤抑制因子或促进因子调节肿瘤细胞的恶性进展, 为肾癌患者提供新的治疗靶点。本研究中, 我们首次证明了在RCC组织和细胞中circ_0000218的表达上调, 且其高表达水平与T分期级别增加, 局部淋巴结转移和远处转移显著相关, 表明其可作为评估RCC预后的一个重要标志物, 且circ_0000218通过miR-139-3p/SOX2促进肾癌细胞的增殖和转移。

CircRNA在包括RCC在内的人类多种恶性肿瘤中的临床意义日益突出, 由于circRNA的结构中缺乏3'末端和5'末端, 这种特殊结构使得circRNA比线性RNAs稳定得多; 此外, circRNA在调节细胞的生物学表型中具有显著作用, 这有助于circRNA作为新的肿瘤标志物^[4]。研究^[12]指出: 许多异常表达的circRNA在人类多种恶性肿瘤的形成与发展中发挥关键作用, 如circ_0015756通过吸附miR-7促进肝细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移; 而在肾癌中, 生物信息学分析显示circ_0001451参与肿瘤进展的调控过程。此外, 体外实验^[13]证

明circ-0001451对外肿瘤生长有显著抑制作用。然而, circR_ZNF609在RCC组织中显著上调, 并通过miR-138-5p/FOXP4促进肾癌细胞的增殖和侵袭^[14]。本研究中, 我们首次发现RCC肿瘤组织中circ_0000218的表达水平显著上调, 其高表达水平与RCC患者T分期级别增加和局部淋巴结转移等不良预后显著相关, 这些结果表明circ_0000218有望成为RCC预后不良的指标。此外, 功能试验证实: 与对照组相比, 过表达circ_0000218能显著促进RCC细胞的增殖、迁移和侵袭。这些研究提示circ_0000218在RCC中发挥致癌作用。近年来, miRNAs的发现扩大了经典抑癌基因和癌基因的范围, 有研究^[15]证实miRNAs作为治疗癌症的分子的潜在靶点。MiRNAs可直接与其下游mRNA结合, 诱导mRNA降解或抑制翻译, 从而参与各种生理和病理过程^[16]。MiR-615-3p在前列腺癌中显著高表达, 其高表达与患者预后差显著相关, 相关功能研究^[17]提示miR-615-3p促进前列腺癌细胞的增殖和迁移。然而, miR-30c-5p作为肾透明细胞癌的生物标志物, 可通过靶向HSPA5来抑制癌症的进展^[18]。有研究^[10]发现miR-139-3p通过靶向NOB1诱导细胞凋亡并抑制宫颈癌的转移。本研究中, miR-139-3p在肾癌组织和细胞中显著下调, 且Starbase3.0数据库显示miR-139-3p在肾透明细胞癌中低表达, miR-139-3p的表达水平和总体生存期呈负相关; 进一步在肾癌细胞中转染miR-139-3p mimics, 发现可显著抑制RCC细胞的增殖和转移能力, 这些研究充分证实miR-139-3p在RCC中发挥抑癌效应并可作为其预后不良的指标。

值得注意的是, circRNA可以作为内源性竞争性RNA发挥吸附miRNA作用, 从而调节基因表达。Circ_0039569在肾癌组织和细胞中高表达, 且circ_0039569 靶向miR-34a-5p促进RCC的生长和转移^[6]。同样地, circ_000926通过miR-411促进RCC的进展, circ_000926可作为RCC治疗的潜在靶点^[5]。有趣的是, 通过CircInteractome, 我们发现circ_0000218和miR-139-3p之间存在结合位点。同时荧光素酶报告基因实验证实circ_0000218可以吸附miR-139-3p。此外, circ_0000218会引起miR-139-3p表达的降低。我们还发现miR-139-3p模拟物可逆转因过表达circ_0000218对RCC细胞增殖和转移的促进效应。由此推测circ_0000218通过吸附miR-139-3p的表达促进RCC细胞增殖、迁移和侵袭。研究^[14]发现: circRNA吸附miRNA, 而miRNA调控mRNA, 从而形成circRNA-miRNA-mRNA调控网络, 这种circRNA/miRNA/mRNA调控轴在多

种癌症中有重要调节作用, 比如在肾癌中, circ_ZNF609通过miR-138-5p/FOXP4轴促进细胞增殖和侵袭。

SOX2作为肾癌中的促癌基因, 但miR-200c-3p可下调SOX2的表达, 从而通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路来抑制肾癌细胞的生长^[19]。本研究通过TargetScan发现SOX2是miR-139-3p的潜在靶点, 双荧光素酶报告基因实验和qRT-PCR证实miR-139-3p可负向调控SOX2的表达; 此外, 过表达circ_0000218显著促进SOX2的表达。提示circ_0000218可通过miR-139-3p上调SOX2的表达, 并促进肾癌细胞的增殖和转移。

综上, circ_0000218/miR-139-3p/SOX2分子轴可在肾癌的进展中起重要作用, 有望为circ_0000218作为RCC诊断和治疗的标志物提供新的实验依据。然而本研究局限于单中心样本, 将来需要更大的样本证实这一结论。

参考文献

1. Deng H, Huang C, Wang Y, et al. LINC00511 promotes the malignant phenotype of clear cell renal cell carcinoma by sponging microRNA-625 and thereby increasing cyclin D1 expression[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(16): 5975-5991.
2. Yang F, Wu Q, Zhang L, et al. The long noncoding RNA KCNQ1DN suppresses the survival of renal cell carcinoma cells through downregulating c-Myc[J]. *J Cancer*, 2019, 10(19): 4662-4670.
3. Zhong Y, Du Y, Yang X, et al. Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 79.
4. Shang BQ, Li ML, Quan HY, et al. Functional roles of circular RNAs during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 138.
5. Zhang D, Yang XJ, Luo QD, et al. Down-regulation of circular RNA_000926 attenuates renal cell carcinoma progression through microRNA-411-dependent CDH2 inhibition[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(12): 2469-2486.
6. Jin C, Shi L, Li Z, et al. Circ_0039569 promotes renal cell carcinoma growth and metastasis by regulating miR-34a-5p/CCL22[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4935-4945.
7. Kovacova J, Juracek J, Poprach A, et al. MiR-376b-3p is associated with long-term response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma patients[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 16(5): 353-359.
8. Liu S, Wang Y, Li W, et al. miR-221-5p acts as an oncogene and predicts worse survival in patients of renal cell cancer[J]. *Biomed Pharmacother*,

- 2019, 119: 109406.
9. Liu L, Chen L, Wu T, et al. MicroRNA-30a-3p functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting WNT2[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4976-4983.
 10. Huang P, Xi J, Liu S. MiR-139-3p induces cell apoptosis and inhibits metastasis of cervical cancer by targeting NOB1[J]. *Biomed. Pharmacother*, 2016, 83: 850-856.
 11. Chen T, Shao S, Li W, et al. The circular RNA hsa-circ-0072309 plays anti-tumour roles by sponging miR-100 through the deactivation of PI3K/AKT and mTOR pathways in the renal carcinoma cell lines[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3638-3648.
 12. Liu L, Yang X, Li NF, et al. Circ_0015756 promotes proliferation, invasion and migration by microRNA-7-dependent inhibition of FAK in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 2939-2953.
 13. Wang G, Xue W, Jian W, et al. The effect of Hsa_circ_0001451 in clear cell renal cell carcinoma cells and its relationship with clinicopathological features[J]. *J Cancer*, 2018, 9(18): 3269-3277.
 14. Xiong Y, Zhang J, Song C. CircRNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXP4 expression by sponging miR-138-5p in renal carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10646-10654.
 15. Moradi Marjaneh R, Khazaei M, Ferns GA, et al. MicroRNAs as potential therapeutic targets to predict responses to oxaliplatin in colorectal cancer: From basic evidence to therapeutic implication[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(10): 1428-1441.
 16. Yang G, Yang C, She Y, et al. LINC01354 enhances the proliferation and invasion of lung cancer cells by regulating miR-340-5p/ATF1 signaling pathway[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3737-3744.
 17. Laursen EB, Fredsøe J, Schmidt L, et al. Elevated miR-615-3p expression predicts adverse clinical outcome and promotes proliferation and migration of prostate cancer cells[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(12): 2377-2388.
 18. Song S, Long M, Yu G, et al. Urinary exosome miR-30c-5p as a biomarker of clear cell renal cell carcinoma that inhibits progression by targeting HSPAS[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(10): 6755-6765.
 19. Li S, Feng Z, Zhang X, et al. Up-regulation of microRNA-200c-3p inhibits invasion and migration of renal cell carcinoma cells via the SOX2-dependent Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 231.

本文引用: 林其玲, 陈畅. Circ_0000218通过调节miR-139-3p/SOX2分子轴促进肾癌发展[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(9): 2231-2240. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.002

Cite this article as: LIN Qiling, CHEN Chang. Circ_0000218 promoting the progression of renal cell carcinoma by regulating the molecular axis of miR-139-3p/SOX2[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(9): 2231-2240. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.09.002