



circPVT1 通过 miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 轴促进鼻咽癌细胞侵袭迁移*

莫勇真^{1,2)} 王裕民¹⁾ 范春梅²⁾ 晏其佳¹⁾ 曾朝阳²⁾ 蒋卫红¹⁾ 熊芳^{1)**}

(¹⁾ 国家老年疾病临床医学研究中心, 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科, 长沙 410078;

(²⁾ 国家卫健委癌变原理重点实验室和教育部癌变与侵袭原理重点实验室, 中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 **目的** 鼻咽癌是一种来源于鼻咽上皮的恶性肿瘤, 其临床特征之一是易发生淋巴转移, 但是目前鼻咽癌转移的分子机制尚未阐明。circPVT1 是由 *PVT1* 基因 2 号外显子反向拼接形成的环状 RNA (circRNA), 在多种肿瘤中表达上调, 本文探讨了 circPVT1 在鼻咽癌侵袭迁移中的作用和分子机制。**方法** 通过 RT-qPCR 检测 circPVT1 及其下游 miRNA 和 FSCN1 在鼻咽癌细胞的表达情况, Transwell 和划痕愈合实验检测 circPVT1 对鼻咽癌细胞侵袭迁移的影响, RNA pull-down 实验检测 circPVT1 结合的 miRNA, 双荧光素酶报告实验检测 miR-24-3p 和 let-7a-5p 靶向抑制 FSCN1 mRNA 表达。**结果** 在鼻咽癌细胞中过表达 circPVT1 可以促进鼻咽癌细胞侵袭迁移, 而敲低 circPVT1 则可以抑制鼻咽癌细胞的侵袭迁移。进一步研究发现, circPVT1 可以通过竞争性吸附 miR-24-3p 和 let-7a-5p, 上调 FSCN1 的表达, 从而促进鼻咽癌细胞的侵袭迁移。**结论** circPVT1 通过 miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 轴促进鼻咽癌细胞侵袭迁移, 证实 circPVT1 是鼻咽癌发生发展过程中一个重要驱动因子。

关键词 鼻咽癌, circPVT1, 侵袭迁移, miR-24-3p, let-7a-5p, FSCN1

中图分类号 Q2, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0010

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种来源于鼻咽上皮的恶性肿瘤, 在东南亚国家和中国南方地区高发^[1]。其发病部位隐蔽, 早期症状不明显或者没有特异性, 大部分鼻咽癌患者确诊时已出现颈部淋巴结转移^[2-4]。尽管目前调强放疗和联合化疗在早期鼻咽癌患者中取得了较好的疗效, 但在部分中晚期患者中疗效不佳^[5-8]。因此, 深入研究鼻咽癌转移的分子机制, 寻找新的分子标记和治疗靶点, 已成为该领域迫切需要解决的科学问题。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是由前体 RNA 反向剪接形成首尾相连、无 5'端帽子和 3'端 PolyA 尾的一类特殊构型 RNA, 现已发现 circRNA 在人体内广泛表达^[9-11]。由于没有游离的 5'和 3'端, circRNA 比线性 RNA 更稳定, 加上它们含量丰富, circRNA 作为分子标志物在疾病的辅助诊断方面具有明显的优势^[12]。circRNA 还可通过多种途径发

挥重要的生物学功能, 包括: 作为微小 RNA (microRNA, miRNA) 海绵通过竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 形式调控其他基因表达^[13]; 结合其他蛋白质并影响靶蛋白的表达和功能^[14]; 或直接翻译出小肽发挥功能^[15]等。越来越多的证据表明, circRNA 在包括恶性肿瘤在内的多种人类疾病的发生发展中起着至关重要的作用^[16-18]。然而, 大量 circRNA 在鼻咽癌发生发展中的功能和调控机制还值得深入研究。

circPVT1 是由长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) *PVT1* 基因的第 2 号外显子反向拼接而成, 在多种肿瘤中表达上调并可促进肿

* 国家自然科学基金 (82203496, 82002239) 和湖南省自然科学基金 (2023JJ30955, 2021JJ41027) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-84805446, E-mail: xiongfa@csu.edu.cn

收稿日期: 2023-01-09, 接受日期: 2023-06-20

瘤的增殖和耐药等表型^[19-20], 在鼻咽癌患者中已发现 circPVT1 可以结合 β -TrCP 蛋白, 阻断 β -TrCP 与 c-Myc 结合, 从而抑制 c-Myc 的泛素化降解, 促进鼻咽癌转移^[21], 然而 circPVT1 是否还有其他作用机制值得更深入研究。本文发现 circPVT1 还可以通过吸附 miR-24-3p 和 let-7a-5p 上调 FSCN1 的表达, 促进鼻咽癌细胞的侵袭和迁移, 这些数据进一步证实了 circPVT1 是鼻咽癌发生发展过程中的一个重要驱动因子, 并为鼻咽癌的诊疗提供了一个潜在的分子标记和靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞系

本研究所用到的鼻咽癌细胞系 CNE2、HNE2 均为本课题组所在分子遗传实验室冻存, 培养条件: 含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, MA, USA) 和 1% 双抗 (青霉素、链霉素) (Life Technologies, NY, USA) 的 RPMI1640 液体培养基 (Life Technologies, NY, USA), 在含 5% CO₂ 的 37°C 恒温培养箱内培养。

1.2 circPVT1 过表达质粒, siRNA

为了获得 circPVT1 的过表达载体, 通过 PCR 扩增 *PVT1* 基因 2 号外显子, 并将其克隆到本实验室设计改良的 circRNA 空白载体 pCirc 质粒中。靶向敲低 circPVT1 的 siRNA 序列: 5'-UCAGGCC-UCAAGCCCAGCUGAGC-3', 在吉玛公司 (Shanghai, China) 合成。过表达载体转染使用 Lipofectamine 3000 (Life Technologies, NY, USA), siRNA 转染使用 Hiperfect (Qiagen, Hilden, Germany)。

1.3 RT-qPCR

对于 circPVT1 及其下游 mRNA 检测, 使用 Vazyme (Vazyme, Nanjing, China) 逆转录试剂盒将细胞总 RNA 逆转录为 cDNA。用 SYBR Green (Biomake, Shanghai, China) 进行 RT-qPCR 分析, GAPDH 和 β -actin 作为内参。对于 miRNA 检测, 使用 miDETECTA Track™ miRNA RT-qPCR 试剂盒 (RiboBio, Guangzhou, China) 进行逆转录和 RT-qPCR, U6 用作检测 miRNA 表达的内参。本研究使用的引物由上海生工公司 (Shanghai, China) 合成。miRNA 引物由 RiboBio (Guangzhou, China) 设计合成。

1.4 划痕和 Matrigel 胶侵袭实验

划痕实验用于检测鼻咽癌细胞迁移能力: 将鼻咽癌细胞接种在 6 孔板中, 分别转染 circPVT1 过表达载体或 siRNA (及它们对应的空白质粒和无义对照 RNA (scramble RNA) 序列) 后, 待单层细胞生长至接近汇合时, 使用 10 μ l 枪头在 6 孔板中划痕; 洗掉脱落细胞换上无血清 1640 培养基后在显微镜下拍照, 即为 0 h, 继续培养 24 h 后在显微镜下拍照, 划痕宽度使用 Image J 软件进行统计。为了检测细胞侵袭能力, 将 Transwell 小室 (8-mm pores; Millipore, NY, USA) 放置在 24 孔板中, 然后向 Transwell 小室中加入 20 μ l 10% Matrigel 胶 (BD Biosciences, NJ, USA), 放到 37°C 培箱中 2 h 待 Matrigel 凝固, 然后将分别转染 circPVT1 过表达载体或 siRNA (及它们对应的空白质粒和 Scramble RNA 序列) 后的鼻咽癌细胞在无血清培养基中重悬并计数, 按每 200 μ l 中 20 000 个鼻咽癌细胞加到 Transwell 上层小室中, 将含 20% FBS 的培养基添加到小室底部的 24 孔板中, 37°C 培养箱中培养 48 h, 之后将侵入小室底部的鼻咽癌细胞用 4% 多聚甲醛固定, 并用 5% 结晶紫染色后进行拍照, 用 Image J 软件统计穿过 Matrigel 的细胞数目。

1.5 circRNA pull-down 实验

为了找到与 circPVT1 结合的 miRNAs, 基于拼接位点设计了与 circPVT1 反向互补的探针, 探针序列为: 5'-GCCAAAAGATCAGGCCTCAAGCCC-AGCTGA-3', 探针 5' 和 3' 端均标记生物素基团, 由上海生工公司 (Shanghai, China) 合成。先将生物素标记的 circPVT1 探针与链霉素亲和磁珠在室温孵育 2 h。将鼻咽癌细胞进行裂解和超声处理后, 将细胞裂解液加入到探针-磁珠混合液中, 37°C 孵育过夜, 随后洗脱磁珠, 使用 Trizol 提取 RNA 进行后续的逆转录和 RT-qPCR 实验。

1.6 蛋白质免疫印迹实验

收集转染后的鼻咽癌细胞于 1.5 ml EP 管中, 用预冷的 PBS 洗涤 3 遍, 1 000 r/min 离心 5 min。加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 30 min。之后 12 000 r/min, 4°C 离心 20 min, 转移上清至新的 EP 管内, 使用 BCA 法进行蛋白质浓度测定。在等量蛋白质 (40 μ g) 中加入蛋白质上样缓冲液, 煮沸 10 min 后置于冰上 2 min 使蛋白质变性。变性后的蛋白质经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(5%浓缩胶, 10%分离胶)分离后, 电转90 min至PVDF膜上。PVDF膜用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 4℃条件下孵育一抗(1:1 000)过夜, 一抗分别为FSCN1 (14384-1-AP)、GAPDH (60004-1-Ig)购于武汉三鹰生物技术有限公司。孵育一抗的PVDF膜用TBST缓冲液漂洗3次, 每次10 min, 随后与山羊抗兔或抗鼠IgG二抗(1:10 000)室温孵育1 h。用TBST漂洗3次, 每次10 min。最后使用化学发光成像系统拍照。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

通过双荧光素酶报告基因实验检测miRNAs是否可以靶向FSCN1的3'非翻译区(3'-UTR)。当鼻咽癌细胞长至对数期后, 将其接种在24孔板中, 并将miR-24-3p和let-7a-5p的模拟物(mimics)或抑制剂(inhibitor)以及相应的对照序列(RiboBio, Guangzhou, China)转染细胞, 同时共转染荧光素酶报告质粒(FSCN1-WT、FSCN1-Mutant)和pRL-TK Renilla内参质粒(Promega, WI, USA)。48 h后, 使用Dual-Luciferase®Reporter Assay试剂盒(Promega, WI, USA)进行检测。使用海肾荧光素酶(Renilla)活性作为内参, 评估不同组之间的相对荧光值变化。

1.8 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, USA)分析数据和作图, 通过Student's *t*检验和卡方检验评估两组或多组数据之间的显著差异。实验至少重复3次, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 circPVT1促进鼻咽癌细胞的侵袭和迁移

具备侵袭和迁移能力是肿瘤细胞发生转移的前提, 为了探究circPVT1对鼻咽癌细胞侵袭迁移能力的影响, 本文构建了circPVT1的过表达载体, 基于拼接位点设计并合成了敲低circPVT1的siRNA (si-circPVT1), 连同作为对照的空白质粒(vector)和scramble RNA序列(siCtrl)分别转染到鼻咽癌细胞中。通过RT-qPCR检测circPVT1的过表达和敲低效果, 结果表明, 在鼻咽癌细胞CNE2和HNE2中成功过表达和敲低circPVT1, 且对线性lncPVT1表达无显著影响(图1a, b)。划痕实验结果表明, 过表达circPVT1后鼻咽癌细胞的

迁移能力明显增强, 敲低circPVT1鼻咽癌细胞的迁移能力减弱(图1c)。Transwell基质胶侵袭实验结果表明, 过表达circPVT1细胞的侵袭能力明显增强, 敲低circPVT1鼻咽癌细胞的侵袭能力减弱(图1d)。以上结果表明, circPVT1可以促进鼻咽癌细胞的侵袭和迁移。

2.2 circPVT1通过竞争性结合miR-24-3p和let-7a-5p促进鼻咽癌细胞侵袭迁移

circRNA通常作为miRNA的“海绵”吸附miRNA解除对下游靶基因的抑制作用发挥功能, 为了探究circPVT1是否通过吸附miRNA促进鼻咽癌细胞侵袭和迁移, 本文通过miRanda、RegRNA2.0和RNA22 3个生物信息学软件预测可能与circPVT1结合的miRNAs, 通过整合分析这3个生物信息软件预测的结果, 发现4个miRNAs(miR-24-3p、let-7a-5p、miR-1226-5p和miR-423-5p)最可能与circPVT1结合(图2a)。随后设计并合成与circPVT1反向互补匹配带生物素标记探针, 通过RNA pull-down实验验证与circPVT1结合的miRNAs。结果表明, RNA pull-down获得的RNA复合物中可以检测到miR-24-3p和let-7a-5p, 而没有检测到miR-1226-5p和miR-423-5p(图2b), 提示在鼻咽癌细胞中circPVT1可能通过竞争性吸附miR-24-3p和let-7a-5p发挥生物学功能。为了明确circPVT1与miR-24-3p/let-7a-5p结合的序列, 通过生物信息学网站预测miR-24-3p/let-7a-5p结合circPVT1的种子序列, 并构建包含circPVT1种子序列的野生型和突变型的荧光素酶报告质粒(图2c), 然后在鼻咽癌细胞中共转染报告质粒和miR-24-3p/let-7a-5p mimics, 结果表明, 转染了miR-24-3p/let-7a-5p mimics后野生型报告基因荧光素酶活性降低, 而对突变型报告质粒荧光素酶活性无影响(图2d)。以上结果表明miR-24-3p和let-7a-5p可以与circPVT1结合。为了进一步证明circPVT1通过miR-24-3p和let-7a-5p促进鼻咽癌细胞侵袭迁移, 在鼻咽癌细胞中过表达circPVT1同时转染miR-24-3p或let-7a-5p mimics, 结果表明, circPVT1表达上调可以促进鼻咽癌细胞的侵袭迁移, 而同时在鼻咽癌细胞中过表达miR-24-3p或let-7a-5p可以逆转circPVT1对鼻咽癌细胞侵袭迁移的影响(图2e)。以上结果表明, circPVT1可以竞争性结合miR-24-3p和let-7a-5p增强鼻咽癌细胞侵袭迁移能力。

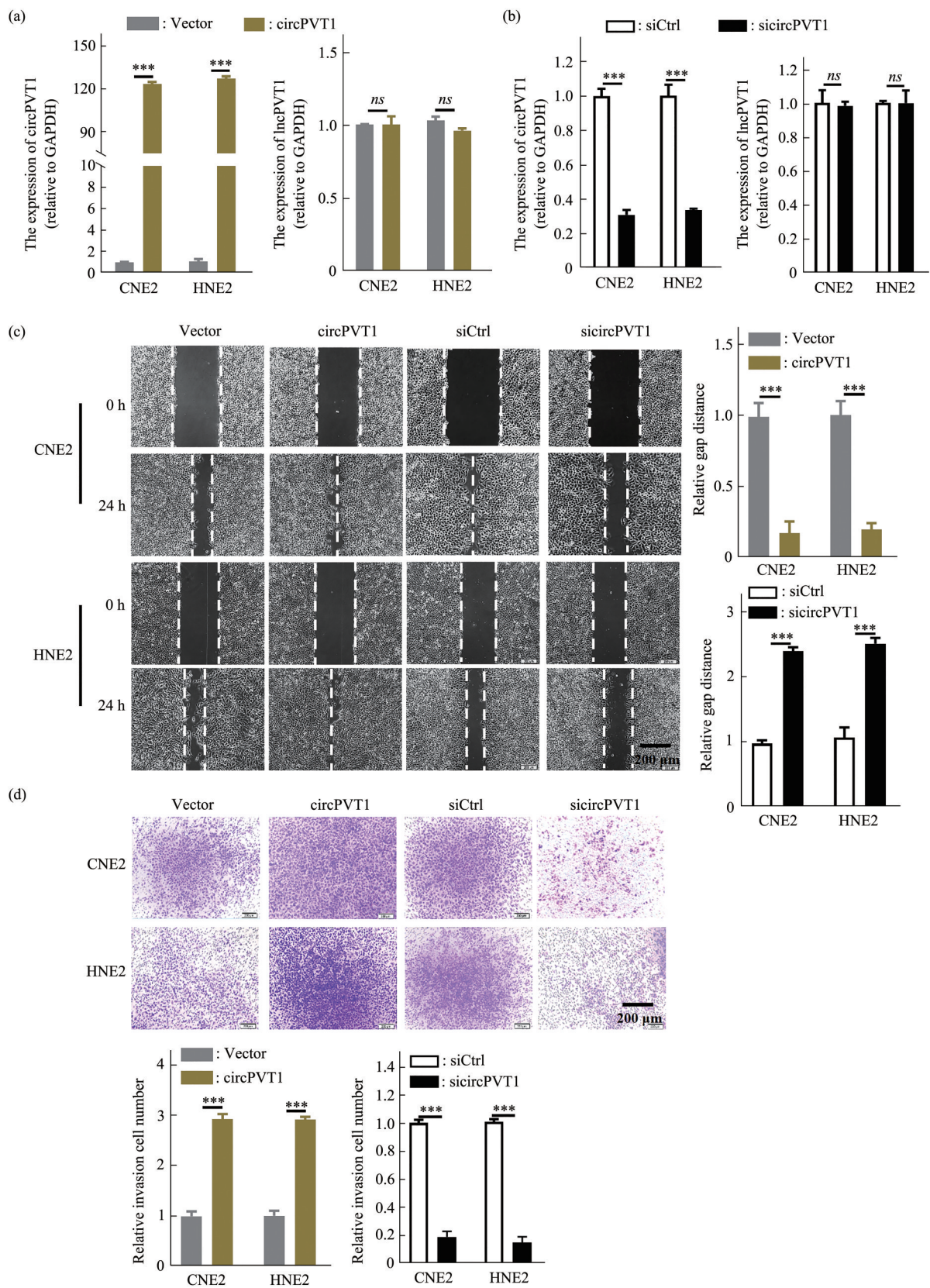


Fig. 1 circPVT1 promotes the invasion and migration of NPC cells

(a,b) The expression of circPVT1 were measured in CNE2 and HNE2 cells after transfection with the circPVT1 overexpression vector or siRNA. lncPVT1 expression was not affected in CNE2 and HNE2 cells after overexpression or knockdown of circPVT1. All experiments were repeated three times. Data were represented as *mean*±*SD*. ****P*<0.001; *ns*, not significant. (c) Wound healing assay showed that circPVT1 promoted CNE2 and HNE2 cell migration. Images were acquired at 0 and 24 h. Data were represented as *mean*±*SD*. ****P*<0.001. (d) Transwell assay showed that circPVT1 promoted CNE2 and HNE2 cell invasion. Data were represented as *mean*±*SD*. ****P*<0.001.

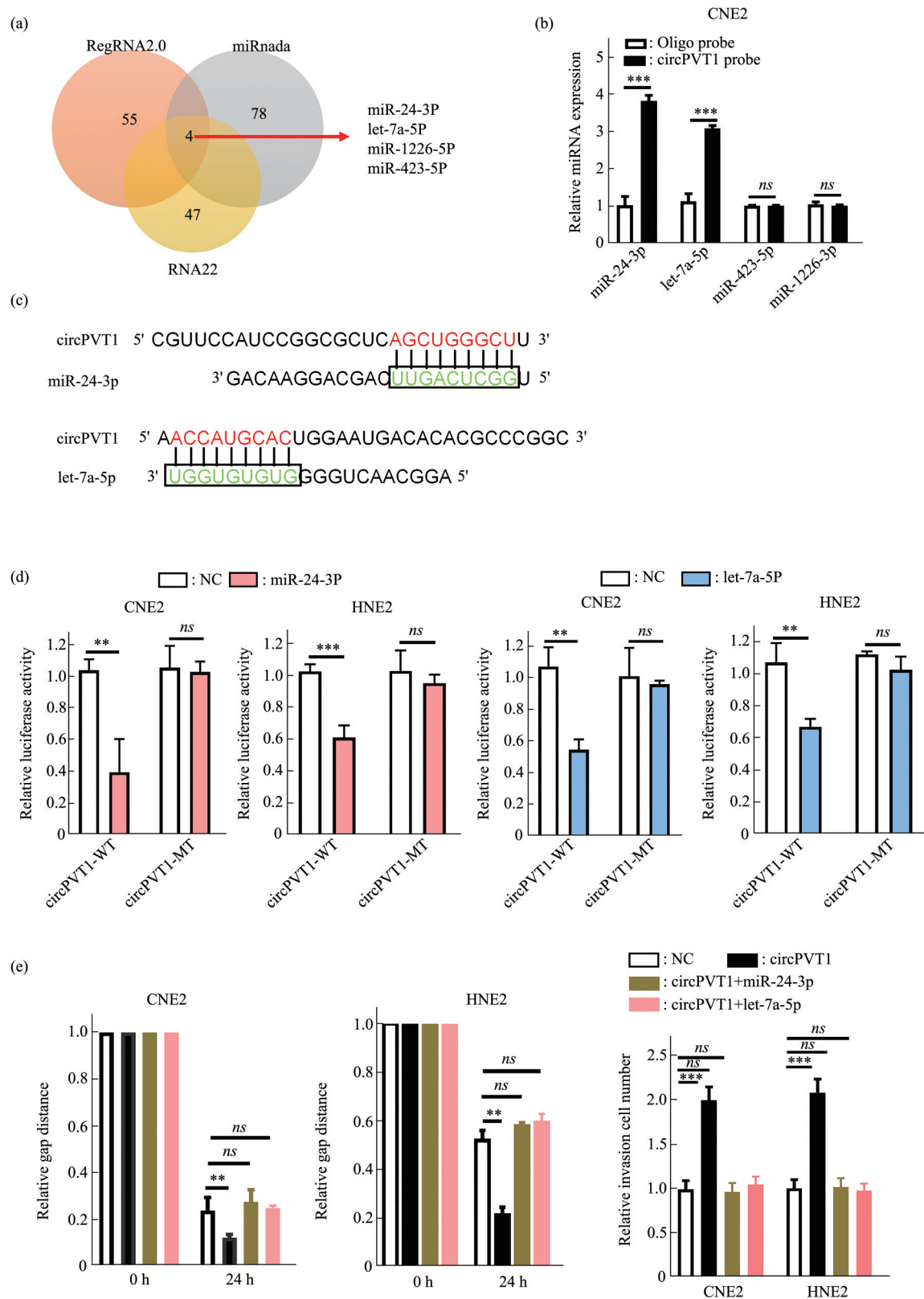


Fig. 2 circPVT1 promotes invasion and migration of NPC cells by competitively binding miR-24-3p and let-7a-5p

(a) The potential binding miRNAs for circPVT1 are predicted by three bioinformatics software (miRanda, RegRNA2.0 and RNA22). (b) Binding of circPVT1 and predicted miRNAs was analyzed in CNE2 cells after RNA pull-down with biotin-labeled circPVT1 probe. The biotin-labeled scrambled sequences was used as control. Data were represented as $mean \pm SD$. *** $P < 0.001$; ns, not significant. (c) Schematic diagram of the predicted binding sites for miR-24-3p and let-7a-5p on circPVT1. (d) Luciferase reporter assay showed that co-transfection of miR-24-3p or let-7a-5p mimics with the constructed circPVT1-WT plasmid obviously decreased luciferase activity, whereas co-transfection with mutant (MT) circPVT1 did not. Data were represented as $mean \pm SD$. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant. (e) Wound healing (left panel) and Transwell (right panel) assay showed that overexpression of miR-24-3p and let-7a-5p reverses the invasive and migrative ability of circPVT1 in NPC cells. Data were represented as $mean \pm SD$. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant.

2.3 circPVT1促进鼻咽癌细胞中FSCN1的表达

以上结果表明, circPVT1通过吸附miR-24-3p和let-7a-5p促进鼻咽癌细胞的侵袭和转移, 但是具体通过调控哪个靶基因发挥作用还不清楚, 为了寻找受circPVT1调控且是miR-24-3p/let-7a-5p共同靶向的mRNA, 本文在鼻咽癌细胞HNE2中敲低circPVT1后利用高分辨质谱平台进行全蛋白质组检测, 然后以肽段覆盖面积(area)作为筛选指标, 通过对照组area与敲低组area比值获得每个蛋白质表达丰度的比值, 然后以area比值大于2作为筛选差异蛋白质的阈值, 在敲低circPVT1前后鼻咽癌细胞中一共获得了151个差异表达蛋白质。接下来, 通过生物信息学网站Targetsan和miRNADB预测miR-24-3p/let-7a-5p共同靶向的mRNAs, 以结合的最小自由能(minimum free energy, MEF)作为筛选标准, 最小自由能的阈值设定为 <-25 kcal/mol, 通过预测发现miR-24-3p和let-7a-5p共同靶向的mRNAs有353个。最后整合分析蛋白质组学数据以及miR-24-3p和let-7a-5p共同的潜在靶mRNA, 发现FSCN1和MATR3在敲低circPVT1的鼻咽癌细胞中表达下调, 且最有可能是miR-24-3p和let-7a-5p下游靶基因(图3a)。在鼻咽癌细胞CNE2和HNE2中分别过表达或敲低circPVT1后检测FSCN1和MATR3在RNA和蛋白质水平变化, 结果表明, 与对照组相比, circPVT1过表达后FSCN1表达上调, circPVT1敲低后FSCN1表达下调, 而MATR3表达变化不显著(图3b, c)。以上结果表明, circPVT1可能通过吸附miR-24-3p/let-7a-5p这两个miRNA促进鼻咽癌细胞中FSCN1的表达。FSCN1属于肌动

蛋白, 主要调控细胞骨架重塑, 包括微管、微丝、中间丝的动态组装及骨架相关蛋白质的表达改变, 以及和侵袭性伪足的形成促进细胞运动。通过对circPVT1调控的差异蛋白质进行DAVID通路富集分析, 发现这些差异蛋白质主要富集在细胞黏附和肌动蛋白调控的骨架重塑上(图3d)。以上结果也提示, circPVT1可能通过上调FSCN1影响鼻咽癌细胞微管组装, 重塑细胞骨架, 使鼻咽癌细胞更容易形变从而突破基底完成侵袭和迁移。

2.4 circPVT1通过miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1轴促进鼻咽癌细胞侵袭迁移

为了确证miR-24-3p和let-7a-5p直接靶向抑制FSCN1的表达, 通过生物信息学软件预测miR-24-3p和let-7a-5p在FSCN1 mRNA 3'-UTR上潜在的种子序列, 并构建包含FSCN1 3'-UTR野生型和突变型的荧光素酶报告质粒(图4a), 然后在鼻咽癌细胞中共转染报告质粒和miR-24-3p/let-7a-5p mimics或inhibitor, 结果表明转染了miR-24-3p/let-7a-5p mimics组报告基因荧光素酶活性降低, 转染miR-24-3p和let-7a-5p inhibitor组荧光酶活性升高, 而突变结合序列的报告质粒荧光素酶活性无影响(图4b)。这些结果证实, miR-24-3p和let-7a-5p可以直接靶向抑制FSCN1的表达。进一步在鼻咽癌细胞过表达circPVT1同时敲低FSCN1, 结果表明敲低FSCN1可以削弱circPVT1对鼻咽癌细胞侵袭和迁移能力的影响(图4c), 基于上述结果, 证实circPVT1通过miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1轴促进鼻咽癌细胞的侵袭和迁移。

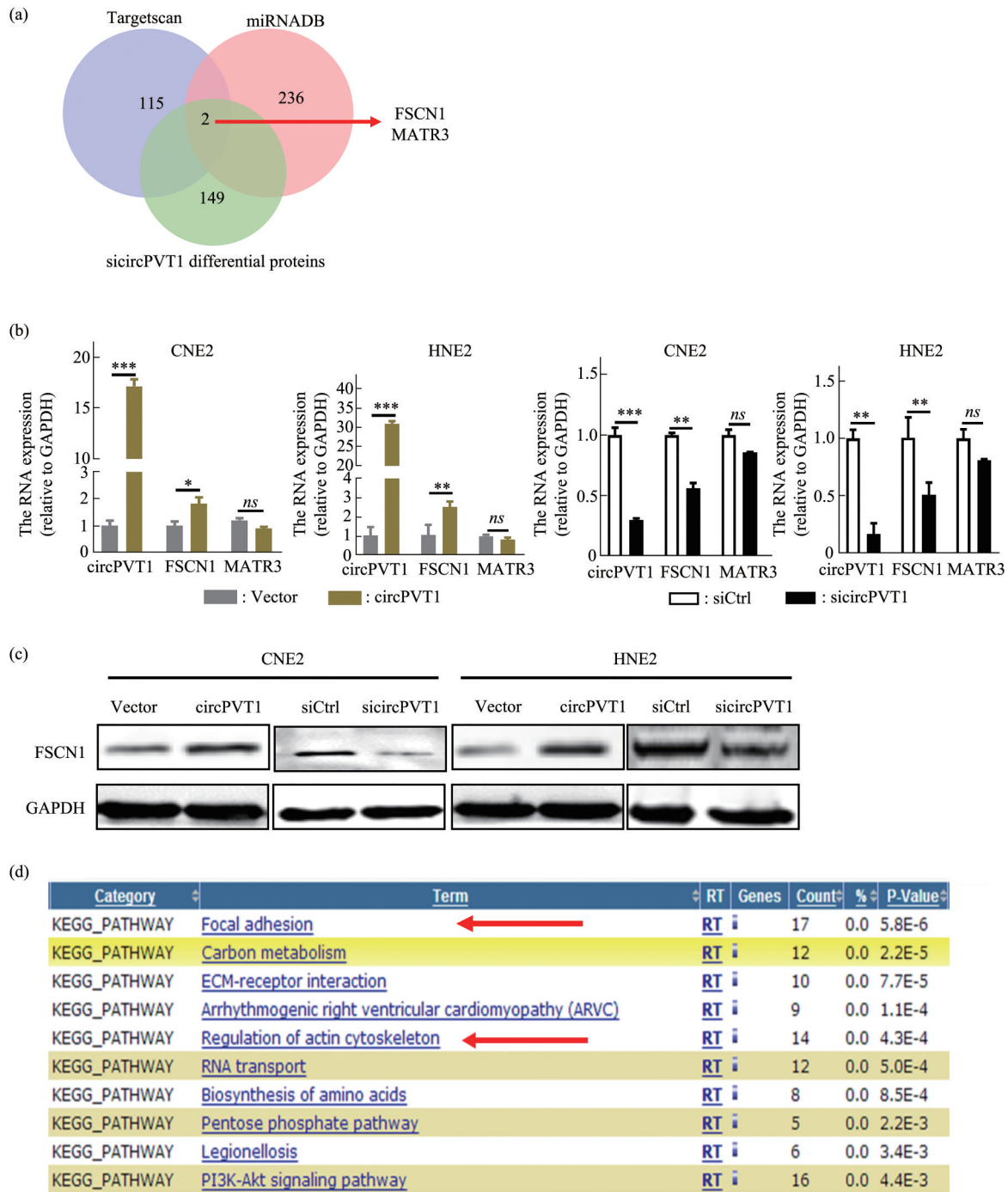


Fig. 3 circPVT1 promotes FSCN1 expression in NPC cells

(a) The target genes of miR-24-3p and let-7a-5p were analyzed using bioinformatics software and differential proteins of circPVT1 knockdown. (b) The RNA expression of FSCN1 and MATR3 in CNE2 and HNE2 cells after overexpression or knockdown of circPVT1 was examined using RT-qPCR. Data were represented as $mean \pm SD$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant. (c) The protein expression of FSCN1 was examined in CNE2 and HNE2 cells after overexpression or knockdown of circPVT1 by Western blot. (d) Pathways enriched by the 151 potentially regulated proteins by circPVT1 using the DAVID website.

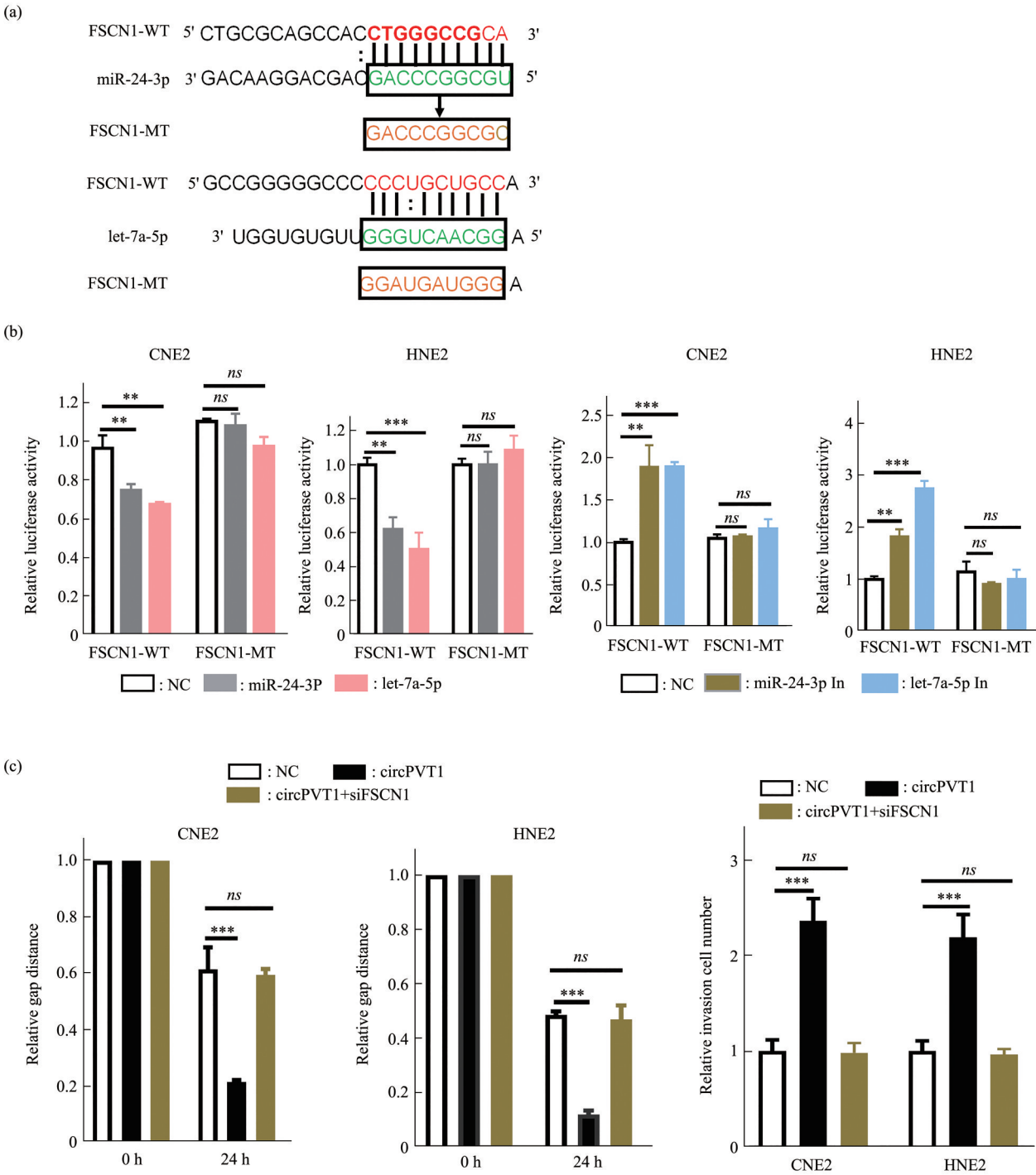


Fig. 4 circPVT1 promotes invasion and migration of NPC cells through the miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 axis

(a) Schematic diagram of the predicted binding sites for miR-24-3p and let-7a-5p on FSCN1 3'-UTR. The putative binding sites were predicted using RNAhybrid website, and the mutations in these sites are indicated. (b) The luciferase activity of wild type (WT) FSCN1 was inhibited by miR-24-3p or let-7a-5p overexpression, whereas the luciferase activity of mutant (MT) FSCN1 remained unchanged upon co-transfection with two miRNAs. Data were represented as $mean \pm SD$. $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; ns , not significant. In: inhibitor. (c) Wound healing (left and middle panels) and Transwell (right panel) assay showed that knockdown FSCN1 reverses the invasive and migrative ability of cicPVT1 in NPC cells. Data were represented as $mean \pm SD$. $***P < 0.001$, ns , not significant.

3 讨 论

circRNA 近年来已成为生物医学研究的前沿热点^[22-24], 特别是它们在恶性肿瘤发生发展中的作用引起了广泛关注。尽管已鉴定的 circRNA 多达数万种, 但大部分 circRNA 的功能尚不清楚, circRNA 在鼻咽癌发生发展过程中的研究更少。目前关于 circRNA 参与鼻咽癌发生发展的报道有: Tang 等^[25]发现 circSETD3 作为竞争性内源性 RNA, 通过与 MAPRE1 竞争结合 miR-615-5p 和 miR-1538 促进鼻咽癌侵袭转移; Fan 等^[26]发现 circARHGAP12 通过直接结合 EZR mRNA 的 3'-UTR 促进其稳定性来促进鼻咽癌细胞的侵袭和转移; Mo 等^[27]发现 circRNF13 直接结合并稳定 SUMO2 mRNA 来抑制鼻咽癌的增殖和转移。

本文发现 circPVT1 通过 miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 轴促进鼻咽癌细胞的侵袭和迁移。circPVT1 是一个来源于 *PVT1* 基因 2 号外显子的 circRNA。*PVT1* 基因主要编码具有癌基因功能的 lncRNA, lncPVT1 可促进癌细胞的生长和放化疗抵抗等, 从而在多种恶性肿瘤发生发展中发挥重要作用^[28-30]。circPVT1 首次在胃癌中被发现, 并证实它能促进胃癌的发生发展^[31]。随着研究的深入, circPVT1 在多种恶性肿瘤中都发挥了重要作用, 目前发现 circPVT1 发挥功能的作用机制研究最多的是它作为 miRNA 分子“海绵”, 从而在转录后水平上增加 miRNA 靶基因的表达促进肿瘤进展。如 Chen 等^[31]发现 circPVT1 可以作为 miR-125 家族的“海绵”促进胃癌的进展; Wan 等^[32]发现 circPVT1 结合 miR-423-5p 促进骨肉瘤侵袭转移; Shi 等^[33]发现 circPVT1 通过吸附 miR-30d 和 miR-30c 促进肺鳞状细胞癌进展等。

目前广泛证实 circRNA 可作为 miRNA 海绵, 特异性的结合 miRNA, 从而通过 ceRNA 的作用机制调控下游基因的表达。ceRNA 假说提出了一种 RNA 在转录后水平调控基因表达的机制, 即 mRNA、lncRNA 和 circRNA 等通过竞争结合相同的 miRNA 来影响靶基因 mRNA 的稳定性或翻译活性, 实现转录后水平的基因表达调节^[34]。miRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA, 主要通过目标基因的 3'-UTR 进行碱基配对, 在转录后水平上调节蛋白质的表达。在生物体内大约有 60% 的基因受到 miRNAs 的调控, miRNAs 的异常表达与癌症的发生发展密切相关^[35-36]。同一个

circRNA 在不同组织细胞中竞争性结合的 miRNA 不同, 通过 miRNA 调控的下游 mRNA 不一样, 产生的效应也可能不相同。如: circHIPK3 在不同肿瘤中就发挥不同的功能, 在结直肠癌中 circHIPK3 过表达通过上调 miR-7 关键靶基因 *EGFR*、*IGF1R*、*FAK* 和 *YY1* 的表达, 促进结直肠癌的进展^[37]; 在胆囊癌细胞中 circHIPK3 通过吸附 miR-124 促进增殖的靶基因 *IL6R* 和 *DLX2* 的表达促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[38]; 在膀胱癌中 circHIPK3 可以充当 miR-558 海绵来抑制乙酰肝素酶的表达抑制膀胱癌的生长和转移^[39]。这些发现使 RNA 间的相互作用在不同组织细胞中形成复杂的调控网络。

本研究探讨了 circPVT1 在鼻咽癌侵袭迁移中的作用及机制, 发现 circPVT1 可以竞争性吸附 miR-24-3p 和 let-7a-5p 这两条 miRNA 从而上调 FSCN1 的表达, 促进鼻咽癌细胞的侵袭迁移, 这进一步完善了对 circPVT1 生物学功能和机制的了解。let-7a 是著名的发挥抑癌作用的 miRNA, 在多种肿瘤中表达下调, 它通过靶向癌基因 (包括 *MYC*、*KRAS* 和 *HMG A2*) 作为主要的肿瘤抑制因子抑制肿瘤的发生发展^[40]。miR-24-3p 在多种肿瘤中根据靶基因的不同发挥不同的功能, 研究发现 miR-24-3p 可以抑制癌细胞增殖和迁移, 促进癌细胞凋亡^[41]等。

FSCN1 是肌动蛋白结合蛋白家族中的一员, 在肿瘤组织中高表达, 而在生物体内正常组织中表达较低。该蛋白质作为一种特异性的肌动蛋白集束蛋白, 可以将肌动蛋白丝捆绑聚合, 参与细胞膜丝状伪足的形成以及编码细胞骨架蛋白通过促进细胞的侵袭迁移参与肿瘤的发生发展过程^[42]。研究表明, FSCN1 在多种肿瘤中高表达且促进肿瘤的生长和转移, 靶向 FSCN1 可以抑制肿瘤的进展^[43-45]。与这些研究一致, 本文发现 circPVT1 通过吸附 miR-24-3p 和 let-7a-5p 两个 miRNA, 上调 FSCN1 的表达促进鼻咽癌细胞的侵袭迁移, 表明 circPVT1 可以通过调控细胞骨架重塑促进鼻咽癌的侵袭和转移, 这为以 circPVT1 及其下游 FSCN1 为靶点抑制鼻咽癌细胞骨架重塑抑制转移提供了一个新思路。

总之, 鼻咽癌的发生发展是一个多基因参与、多阶段变异累积的病理过程, mRNA、miRNA、circRNA 之间形成的复杂调控网络在鼻咽癌的进展, 包括侵袭转移过程中发挥了重要作用^[46-50]。本文的研究结果揭示了 circPVT1 通过 miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 轴促进鼻咽癌细胞侵袭和迁移,

为鼻咽癌侵袭转移调控网络提供了新的发现。但 circPVT1 是否还参与了鼻咽癌的其他恶性生物学表型, 它更多的临床价值, 包括在放化疗抵抗和免疫治疗耐受等方面的作用和机制, 以及 circPVT1 在鼻咽癌患者血清中的表达水平如何, 是否可以作为鼻咽癌患者早期诊断的标记等将是下一步研究的课题。

4 结 论

综上所述, 本文探讨了 circPVT1 在鼻咽癌中的作用, 发现 circPVT1 可以吸附 miR-24-3p 和 let-7a-5p, 上调 FSCN1 的表达, 通过 miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 轴促进鼻咽癌细胞侵袭迁移, 进一步证实了 circPVT1 是鼻咽癌转移过程中一个重要驱动因子。这些发现丰富了鼻咽癌发病机制中的基因表达调控网络, 并为鼻咽癌的诊疗提供了新的线索。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Yan Q, Fan C, *et al.* Overview and countermeasures of cancer burden in China. *Sci China Life Sci*, 2023; 1-12. doi: 10.1007/s11427-022-2240-6
- [2] Jiang X, Deng X, Wang J, *et al.* BPIFB1 inhibits vasculogenic mimicry *via* downregulation of GLUT1-mediated H3K27 acetylation in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 2022, **41**(2): 233-245
- [3] Fan C, Tang Y, Wang J, *et al.* Long non-coding RNA LOC284454 promotes migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma *via* modulating the Rho/Rac signaling pathway. *Carcinogenesis*, 2019, **40**(2): 380-391
- [4] Lian Y, Xiong F, Yang L, *et al.* Long noncoding RNA AFAP1-AS1 acts as a competing endogenous RNA of miR-423-5p to facilitate nasopharyngeal carcinoma metastasis through regulating the Rho/Rac pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, **37**(1): 253
- [5] Wu Y, Wang D, Wei F, *et al.* EBV-miR-BART12 accelerates migration and invasion in EBV-associated cancer cells by targeting tubulin polymerization-promoting protein 1. *FASEB J*, 2020, **34**(12): 16205-16223
- [6] Wang D, Zeng Z, Zhang S, *et al.* Epstein-Barr virus-encoded miR-BART6-3p inhibits cancer cell proliferation through the LOC553103-STMN1 axis. *FASEB J*, 2020, **34**(6): 8012-8027
- [7] Tang T, Yang L, Cao Y, *et al.* LncRNA AATBC regulates Pinin to promote metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Oncol*, 2020, **14**(9): 2251-2270
- [8] Tu C, Zeng Z, Qi P, *et al.* Identification of genomic alterations in nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma-derived Epstein-Barr virus by whole-genome sequencing. *Carcinogenesis*, 2018, **39**(12): 1517-1528
- [9] Wang Y, Mo Y, Gong Z, *et al.* Circular RNAs in human cancer. *Mol Cancer*, 2017, **16**(1): 25
- [10] Zhong Y, Du Y, Yang X, *et al.* Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 79
- [11] Ouyang J, Zhong Y, Zhang Y, *et al.* Long non-coding RNAs are involved in alternative splicing and promote cancer progression. *Br J Cancer*, 2022, **126**(8): 1113-1124
- [12] Fan C M, Wang J P, Tang Y Y, *et al.* circMAN1A2 could serve as a novel serum biomarker for malignant tumors. *Cancer Sci*, 2019, **110**(7): 2180-2188
- [13] He R, Liu P, Xie X, *et al.* circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, **36**(1): 145
- [14] Wu P, Hou X, Peng M, *et al.* Circular RNA circRILPL1 promotes nasopharyngeal carcinoma malignant progression by activating the Hippo-YAP signaling pathway. *Cell Death Differ*, 2023, **30**(7): 1679-1694
- [15] Wu P, Mo Y, Peng M, *et al.* Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA. *Mol Cancer*, 2020, **19**(1): 22
- [16] Wang Y, Mo Y, Peng M, *et al.* The influence of circular RNAs on autophagy and disease progression. *Autophagy*, 2022, **18**(2): 240-253
- [17] Qu H, Chen M, Ge J, *et al.* A fluorescence strategy for circRNA quantification in tumor cells based on T7 nuclease-assisted cycling enzymatic amplification. *Anal Chim Acta*, 2022, **1189**: 339210
- [18] Li M, Wang Y, Wu P, *et al.* Application prospect of circular RNA-based neoantigen vaccine in tumor immunotherapy. *Cancer Lett*, 2023, **563**: 216190
- [19] Zheng X, Rui S, Wang X F, *et al.* circPVT1 regulates medullary thyroid cancer growth and metastasis by targeting miR-455-5p to activate CXCL12/CXCR4 signaling. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, **40**(1): 157
- [20] Verduci L, Ferraiuolo M, Sacconi A, *et al.* The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex. *Genome Biol*, 2017, **18**(1): 237
- [21] Mo Y, Wang Y, Wang Y, *et al.* Circular RNA circPVT1 promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis *via* the beta-TrCP/c-Myc/SRSF1 positive feedback loop. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 192
- [22] Wang Y, Yan Q, Mo Y, *et al.* Splicing factor derived circular RNA circCAMSAP1 accelerates nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis *via* a SERPINH1/c-Myc positive feedback loop. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 62
- [23] Li P, Zhu K, Mo Y, *et al.* Research progress of circRNAs in head and neck cancers. *Front Oncol*, 2021, **11**: 616202
- [24] Ge J, Wang J, Xiong F, *et al.* Epstein-Barr virus encoded circular RNA circBART2.2 promotes immune escape of nasopharyngeal carcinoma by regulating PD-L1. *Cancer Res*, 2021, **81**(19): 5074-5088
- [25] Tang L, Xiong W, Zhang L, *et al.* circSETD3 regulates MAPRE1

- through miR-615-5p and miR-1538 sponges to promote migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 2021, **40**(2): 307-321
- [26] Fan C, Qu H, Xiong F, *et al.* CircARHGAP12 promotes nasopharyngeal carcinoma migration and invasion *via* ezrin-mediated cytoskeletal remodeling. *Cancer Lett*, 2021, **496**: 41-56
- [27] Mo Y, Wang Y, Zhang S, *et al.* Circular RNA circRNF13 inhibits proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma *via* SUMO2. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 112
- [28] Wang W, Zhou R, Wu Y, *et al.* PVT1 promotes pancer progression *via* microRNAs. *Front Oncol*, 2019, **9**: 609
- [29] Jin K, Wang S, Zhang Y, *et al.* Long non-coding RNA PVT1 interacts with MYC and its downstream molecules to synergistically promote tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2019, **76**(21): 4275-4289
- [30] He Y, Jing Y, Wei F, *et al.* Long non-coding RNA PVT1 predicts poor prognosis and induces radioresistance by regulating DNA repair and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(2): 235
- [31] Chen J, Li Y, Zheng Q, *et al.* Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer. *Cancer Lett*, 2017, **388**: 208-219
- [32] Wan J, Liu Y, Long F, *et al.* CircPVT1 promotes osteosarcoma glycolysis and metastasis by sponging miR-423-5p to activate Wnt5a/Ror2 signaling. *Cancer Sci*, 2021, **112**(5): 1707-1722
- [33] Shi J, Lü X, Zeng L, *et al.* CircPVT1 promotes proliferation of lung squamous cell carcinoma by binding to miR-30d/e. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, **40**(1): 193
- [34] Fan C, Xiong F, Tang Y, *et al.* Construction of a lncRNA-mRNA co-expression network for nasopharyngeal carcinoma. *Front Oncol*, 2022, **12**: 809760
- [35] Wang J, Ge J, Wang Y, *et al.* EBV miRNAs BART11 and BART17-3p promote immune escape through the enhancer-mediated transcription of PD-L1. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 866
- [36] Xiong F, Zhu K, Deng S, *et al.* AFAP1-AS1: a rising star among oncogenic long non-coding RNAs. *Sci China Life Sci*, 2021, **64**(10): 1602-1611
- [37] Zeng K, Chen X, Xu M, *et al.* CircHIPK3 promotes colorectal cancer growth and metastasis by sponging miR-7. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(4): 417
- [38] Chen G, Shi Y, Liu M, *et al.* CircHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(2): 175
- [39] Li Y, Zheng F, Xiao X, *et al.* CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells. *EMBO Rep*, 2017, **18**(9): 1646-1659
- [40] Boyerinas B, Park S M, Hau A, *et al.* The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2010, **17**(1): F19-36
- [41] Wang S, Pan Y, Zhang R, *et al.* Hsa-miR-24-3p increases nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting both the 3'UTR and 5'UTR of Jab1/CSN5. *Oncogene*, 2016, **35**(47): 6096-6108
- [42] Chen Y, Tian T, Li Z Y, *et al.* FSCN1 is an effective marker of poor prognosis and a potential therapeutic target in human tongue squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(5): 356
- [43] Li Y Q, Lu J H, Bao X M, *et al.* MiR-24 functions as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma through targeting FSCN1. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, **34**: 130
- [44] Guo L, Bai H, Zou D, *et al.* The role of microRNA-133b and its target gene FSCN1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, **33**(1): 99
- [45] Gao W, Zhang C, Li W, *et al.* Promoter methylation-regulated miR-145-5p inhibits laryngeal squamous cell carcinoma progression by targeting FSCN1. *Mol Ther*, 2019, **27**(2): 365-379
- [46] Tang Q, Li L, Wang Y, *et al.* RNA modifications in cancer. *Br J Cancer*, 2023, **129**(2): 204-221
- [47] Ren D, Mo Y, Yang M, *et al.* Emerging roles of tRNA in cancer. *Cancer Lett*, 2023, **563**: 216170
- [48] Yang M, Mo Y, Ren D, *et al.* Transfer RNA-derived small RNAs in tumor microenvironment. *Mol Cancer*, 2023, **22**(1): 32
- [49] Wang D, Tang L, Zhang Y, *et al.* Regulatory pathways and drugs associated with ferroptosis in tumors. *Cell Death Dis*, 2022, **13**(6): 544
- [50] Fan C, Zhang S, Gong Z, *et al.* Emerging role of metabolic reprogramming in tumor immune evasion and immunotherapy. *Sci China Life Sci*, 2021, **64**(4): 534-547

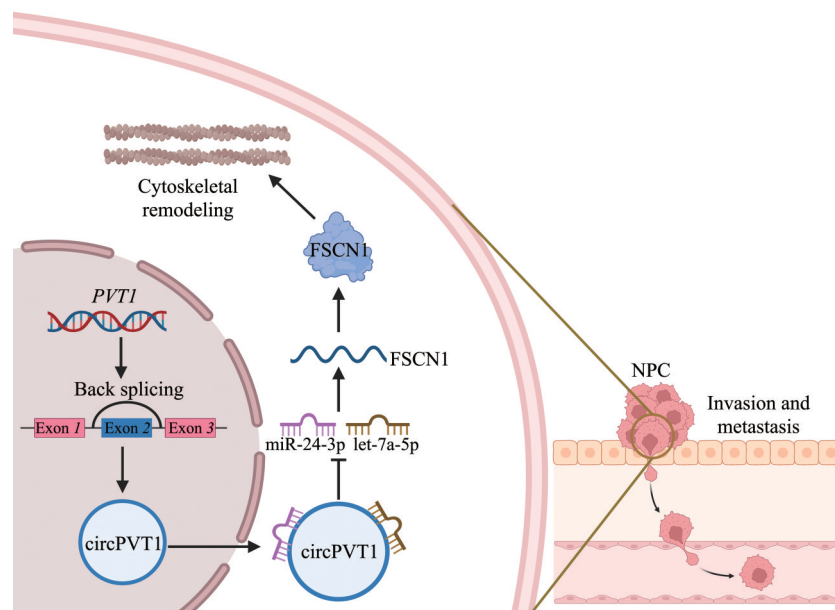
circPVT1 Promotes Invasion and Migration of Nasopharyngeal Carcinoma Cells Through The miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 Axis*

MO Yong-Zhen^{1,2)}, WANG Yu-Min¹⁾, FAN Chun-Mei²⁾, YAN Qi-Jia¹⁾, ZENG Zhao-Yang²⁾,
JIANG Wei-Hong¹⁾, XIONG Fang¹⁾**

⁽¹⁾National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾NHC Key Laboratory of Carcinogenesis and Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of the Chinese Ministry of Education,
Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The study aims to explore the role and molecular mechanism of circPVT1 in invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma (NPC), a malignant tumor originating from nasopharyngeal epithelium with the clinical feature of lymph node metastasis. circPVT1, a circular RNA formed by back splicing of exon 2 of PVT1 gene, has been found to be upregulated in various tumors and plays an important role in tumorigenesis. The study investigated the role and molecular mechanism of circPVT1 in invasion and migration of NPC cells.

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82203496, 82002239) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ30955, 2021JJ41027).

** Corresponding author.

Tel: 86-731-84805446, E-mail: xiongf@csu.edu.cn

Received: January 9, 2023 Accepted: June 20, 2023

Methods We detected the expression of circPVT1 and its downstream miRNAs and FSCN1 in NPC cells using RT-qPCR, and evaluated the effect of circPVT1 on NPC cell invasion and migration using Transwell and scratch healing experiments. RNA pull-down experiment was used to detect the miRNAs bound by circPVT1, and the dual luciferase reporter assay was used to detect the targeting of FSCN1 mRNA by miR-24-3p and let-7a-5p.

Results The study found that overexpression of circPVT1 in NPC cells can promote invasion and migration, while knockdown of circPVT1 can inhibit NPC cells invasion and migration. Further studies revealed that circPVT1 upregulates the expression of FSCN1 by competitively adsorbing miR-24-3p and let-7a-5p.

Conclusion circPVT1 promotes invasion and migration of NPC cells through the miR-24-3p/let-7a-5p/FSCN1 axis, and is an important driving factor in the development of NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma, circPVT1, invasion and migration, miR-24-3p, let-7a-5p, FSCN1

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0010