

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.12.1330

· 论 著 ·

## 环状 RNA circSP3 (hsa-circ-0002642) 促进肝细胞癌细胞增殖及迁移

李墨林<sup>1</sup>, 陈 航<sup>2</sup>, 黄 平<sup>1\*</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016

2. 重庆市铜梁区人民医院肿瘤血液内科, 重庆 402560

**[摘要]** **目的** 探讨环状 RNA circSP3 (hsa-circ-0002642) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达及其对 HCC 细胞增殖及迁移的影响。**方法** 收集重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2017 年 6 月至 2018 年 12 月收治的 42 例 HCC 患者手术切除的癌组织和癌旁组织标本, 采用实时定量 PCR 检测组织中 circSP3 的表达, 分析癌组织中 circSP3 表达与患者临床病理学指标的关系。培养人 HCC 细胞系 Hep-3B、Huh7、SMMC-7721、Bel-7402 及人正常肝细胞系 HL-7702, 采用实时定量 PCR 检测细胞中 circSP3 的表达。使用 circSP3 过表达及干扰质粒分别转染 Hep-3B 和 Huh7 细胞后, 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测细胞增殖情况, Transwell 法检测细胞侵袭和迁移能力, 蛋白质印迹法检测上皮-间质转化 (EMT) 相关标志物波形蛋白、E-钙黏蛋白的表达。**结果** HCC 患者癌组织中 circSP3 的表达高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 并且 circSP3 的表达与 HCC 肿瘤最大径及 TNM 分期呈正相关 ( $P$  均  $< 0.05$ )。circSP3 在 4 种 HCC 细胞系中的表达均高于正常肝细胞系 ( $P$  均  $< 0.01$ )。circSP3 过表达可以促进 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ), 而干扰 circSP3 表达则抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。波形蛋白表达在 circSP3 过表达的 HCC 细胞中高于对照细胞 ( $P < 0.05$ ), 而在干扰 circSP3 表达的 HCC 细胞中低于对照细胞 ( $P < 0.05$ )。E-钙黏蛋白表达在 circSP3 过表达的细胞中低于对照细胞 ( $P < 0.01$ ), 而在干扰 circSP3 表达的 HCC 细胞中高于对照细胞 ( $P < 0.01$ )。**结论** circSP3 的异常表达与 HCC 肿瘤大小及 TNM 分期呈正相关, 有助于评价病情及预后。circSP3 能促进 HCC 细胞的增殖, 并且可能通过促进 EMT 进程进而促进 HCC 细胞的迁移和侵袭。

**[关键词]** 环状 RNA; circSP3; 肝细胞癌; 上皮-间质转化; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)12-1330-07

### Circular RNA circSP3 (hsa-circ-0002642) promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells

LI Mo-lin<sup>1</sup>, CHEN Hang<sup>2</sup>, HUANG Ping<sup>1\*</sup>

1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Oncology and Hematology, The People's Hospital of Tongliang District, Chongqing 402560, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of circular RNA circSP3 (hsa-circ-0002642) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on proliferation and migration of HCC cells. **Methods** The tumor tissue and the adjacent paratumor tissue samples were collected from 42 HCC patients who underwent surgery from Jun. 2017 to Dec. 2018 in Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University. The expression of circSP3 in the samples was detected by real-time quantitative PCR, and the relationship between circSP3 expression in the tumor tissues and clinicopathological parameters of the patients was analyzed. Human HCC cell lines (Hep-3B, Huh7, SMMC-7721 and Bel-7402) and human normal liver cell line (HL-7702) culturion, and the expression of circSP3 was detected. After circSP3 overexpression and interference plasmids transfection into Hep-3B and Huh7 cells, the cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, the invasion and migration abilities were detected by Transwell assay, and expression levels of epithelial-mesenchymal transformation (EMT)-associated markers (vimentin and E-cadherin) were determined by Western blotting. **Results** The expression of circSP3 of tumor tissues was significantly higher than that of the paratumor tissues in the HCC patients ( $P < 0.01$ ), and the expression of circSP3 was positively correlated with the tumor maximum diameter and clinical TNM stage (both  $P < 0.05$ ). The expression levels of circSP3 in the 4 HCC cell lines were significantly higher than that

**[收稿日期]** 2019-07-27 **[接受日期]** 2019-11-11

**[作者简介]** 李墨林, 硕士生. E-mail: 975495195@qq.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89011191, E-mail: huangpchina@sina.com

in the normal liver cell lines (all  $P < 0.01$ ). Overexpression of circSP3 could significantly promote proliferation, invasion and migration of HCC cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while interference circSP3 expression could significantly inhibit the proliferation, invasion and migration ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of vimentin was significantly higher in circSP3-overexpressed cells than that in control cells ( $P < 0.05$ ), while it was significantly lower in circSP3-interfered cells than that in control cells ( $P < 0.05$ ). The expression of E-cadherin was significantly lower in circSP3-overexpressed cells than that in control cells ( $P < 0.01$ ), while it was significantly higher in circSP3-interfered cells than that in control cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The abnormal expression of circSP3 is positively correlated with tumor size and TNM stage of HCC, and determining its expression is helpful to evaluate the severity and prognosis of HCC. CircSP3 can promote the proliferation of HCC cells, and may promote the migration and invasion by promoting the EMT process.

**[Key words]** circular RNAs; circSP3; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transformation; cell proliferation; migration; invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1330-1336]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝脏恶性肿瘤, 是世界范围内严重的健康问题<sup>[1]</sup>。它是全球第五大常见癌症和第三大癌症相关死亡原因<sup>[2]</sup>。转移是 HCC 患者死亡的主要原因。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类新的内源性非编码 RNA, 能够调节哺乳动物的基因表达。与线性 RNA 不同, circRNA 具有共价闭环结构, 没有 5'-3' 极性, 也没有多聚腺苷酸尾<sup>[3-4]</sup>。circRNA 的表达稳定、丰富、保守, 通常在特定组织或特定发育阶段表达<sup>[5-6]</sup>。最近的研究表明, circRNA 可能在许多生理和病理生理过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。更多的研究表明, circRNA 可以作为微 RNA (microRNA, miRNA) 的海绵, 通过与 miRNA 相互作用调节基因表达<sup>[8-9]</sup>。miRNA 的失调和功能在几乎所有生物过程中均已得到了广泛研究, 但新鉴定的 circRNA 的表达和功能还需进一步研究。研究证实, circRNA 失调 (如 circHIPK3 和 circSETD3) 可能在 HCC 进展中发挥重要作用, 直接调控 HCC 的细胞增殖、凋亡和迁移<sup>[10-11]</sup>。本研究拟分析 circRNA circSP3 (hsa-circ-0002642) 在 HCC 患者癌组织和癌旁组织中的表达特点及其在正常肝细胞系和 HCC 细胞系中的表达特点, 揭示 circSP3 对 HCC 细胞增殖、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT)、迁移和侵袭的影响。

## 1 材料和方法

1.1 患者资料 42 例 HCC 患者的癌组织及配对癌旁组织 (距离癌组织边缘  $> 3$  cm) 均为重庆医科大学附属第一医院 2017 年 6 月至 2018 年 12 月

收集的 HCC 手术切除标本。所有组织在切除后立即放入 RNA 保存液中, 然后放置于  $-80$  °C 冰箱备用。所有患者术前均未进行化学治疗和放射治疗, 且术后病理证实为 HCC。其中男 34 例、女 8 例, 国际抗癌联盟 TNM 分期 I ~ II 期 20 例、III ~ IV 期 22 例。所有患者及其家属均签署知情同意书。本研究通过重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审批, 并符合 2013 年《赫尔辛基宣言》的伦理准则。

1.2 细胞株及主要试剂 人 HCC 细胞系 Hep-3B、Huh7、SMMC-7721、Bel-7402 及正常肝细胞系 HL-7702 均由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存。DMEM 培养液和 RPMI 1640 培养液均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 PAN 公司; TRIzol 和 Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司; circRNA 反转录及实时定量 PCR 试剂盒均购自广州吉赛生物科技股份有限公司; circSP3 PCR 引物购自北京擎科生物技术有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自汉恒生物科技 (上海) 有限公司; circSP3 过表达 (ov-circSP3) 及干扰质粒 (si-circSP3) 均购自吉玛基因 (上海) 股份有限公司。对于 circSP3 过表达, 将 circSP3 的全长编码序列克隆到 pcDNA3.1 (+) 载体中, 空白 pcDNA3.1 (+) 载体用作阴性对照<sup>[12]</sup>。si-circSP3 序列为 5'-GUC CUG CAG ACA GGU GAU UTT-3', 阴性对照 si-NC 序列为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 总蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒和聚偏二氟乙烯膜均购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗波形蛋

白(vimentin)、兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)和兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体及羊抗兔二抗均购自北京博奥森生物技术有限公司; ECL试剂盒购自美国Advansta公司。

1.3 细胞培养及转染 Hep-3B、Huh-7细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中, SMMC-7721、Bel-7402细胞及正常肝细胞系HL-7702培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 细胞放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养, 当细胞生长至贴壁达80%~90%时进行传代。在质粒转染实验中, 将处于对数生长期的细胞使用胰酶消化并计数、铺板。选用Huh-7细胞进行circSP3干扰及对照空载质粒转染, 另外选用Hep-3B细胞进行circSP3过表达及对照空载质粒转染。转染前1d将细胞接种于6孔板中, 当细胞融合度达到50%左右时, 按照转染试剂Lipofectamine 2000说明书的步骤进行转染。

1.4 实时定量PCR检测circSP3表达 使用TRIzol试剂提取组织或细胞总RNA。反转录合成cDNA。以cDNA为模板, 使用circRNA实时定量PCR试剂盒进行PCR。引物序列: circSP3正义引物5'-CTC CAG TTA GTC TAA GCA CTG G-3', 反义引物5'-GCC AAA TCA CCT GTC TGC AG-3'; 内参照GAPDH正义引物5'-CAG CTA GCC GCA TCT TCT TTT-3', 反义引物5'-GTG ACC AGG CGC CCA ATA C-3'。每个样品设3个复孔, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算circSP3的相对表达量。

1.5 Transwell法检测细胞侵袭、迁移能力 细胞侵袭能力检测实验: 溶解基底胶(按照1:9稀释基底胶), 向小室上层每孔加入50μL基底胶。细胞转染48h后进行消化、计数, 取约5×10<sup>4</sup>个细胞重悬于200μL无血清DMEM培养液, 加入Transwell上室。向下室加入500μL含10%胎牛血清的DMEM培养液, 然后置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h。取出小室, 用磷酸盐缓冲液清洗3次, 加入4%多聚甲醛溶液固定30min, 用棉棒擦拭清除上室未通过的细胞, 然后用结晶紫染色20min, 磷酸盐缓冲液清洗3次。使用光学显微镜于20倍对下室细胞进行计数及拍照。细胞迁移能力检测实验: Transwell上室不铺基底胶,

其余步骤与侵袭能力检测实验相同。

1.6 蛋白质印迹法检测EMT相关蛋白表达 使用裂解液充分裂解细胞并提取细胞总蛋白, 加入蛋白上样缓冲液混合, 沸水煮10min。每孔上样15μg蛋白质样品, 电泳(80V 40min、120V 80min)、转膜(210mA 100min)。室温下用8%脱脂牛奶封闭2h, 然后4℃过夜标记波形蛋白、E-钙黏蛋白(稀释比例均为1:1000)和GAPDH(1:800)一抗; 然后加入羊抗兔二抗(稀释比例1:1000)室温孵育2h。使用ECL试剂盒进行化学发光显影, 用ImageJ软件进行半定量分析。

1.7 统计学处理 应用SPSS 24.0软件进行统计学分析。所有实验均独立重复3次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间比较采用 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。circSP3表达与患者临床病理指标的关系采用 $\chi^2$ 检验进行分析。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 circSP3在癌及癌旁组织中的表达及其与临床病理指标的关系 如图1所示, 癌组织中circSP3的表达水平高于癌旁组织( $P < 0.01$ )。以癌组织circSP3相对表达量的平均值为界, 23例患者circSP3高表达, 19例患者为低表达。由表1可见, 肿瘤最大径 $\geq 5$ cm和高TNM分期的HCC患者多表现为circSP3高表达( $P$ 均 $< 0.05$ )。表明circSP3可能参与HCC的形成, 且circSP3表达水平与HCC病情的严重程度呈正相关。

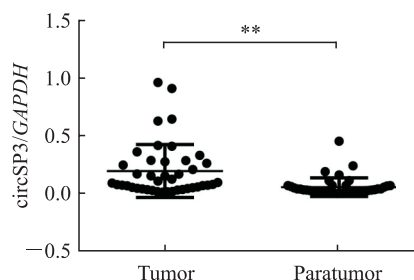


图1 实时定量PCR检测HCC癌组织和癌旁组织中circSP3表达

Fig 1 Expression of circSP3 in HCC tumor and paratumor tissues detected by real-time quantitative PCR HCC: Hepatocellular carcinoma; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \*\* $P < 0.01$ .  $n = 42$

表 1 circSP3 表达与 HCC 患者临床病理指标的相关性

**Tab 1 Correlation between circSP3 expression and clinicopathological characteristics of HCC patients**

Factor	High N=23	Low N=19	$\chi^2$ value	P value	n
Age (year)			0.942	0.332	
<40	5	2			
≥40	18	17			
Gender			0.396	0.529	
Male	19	15			
Female	4	4			
HBsAg			0.090	0.764	
+	19	15			
-	4	4			
HBV DNA			1.354	0.245	
+	15	9			
-	8	10			
AFP $\rho_B$ / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			1.634	0.201	
<400	17	17			
≥400	6	2			
ALT $z_B$ / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )			0.865	0.352	
<40	10	11			
≥40	13	8			
AST $z_B$ / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )			0.096	0.757	
<40	11	10			
≥40	12	9			
$D_{\max}$ d/cm			13.463	<0.01	
<5	4	14			
≥5	19	5			
TNM stage			7.230	0.027	
I	3	9			
II	4	4			
III	16	6			

HCC: Hepatocellular carcinoma; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; HBV: Hepatitis B virus; AFP:  $\alpha$ -fetoprotein; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase;  $D_{\max}$ : Tumor maximum diameter

2.2 circSP3 在人 HCC 细胞系及正常肝细胞系中的表达 如图 2A 所示, 与 HL-7702 细胞相比, Huh-7、Hep-3B、SMMC-7721、Bel-7402 细胞中 circSP3 表达均上调 ( $P$  均 < 0.01)。在 Hep-3B 和 Huh-7 细胞中分别转染 circSP3 过表达和干扰质粒后, circSP3 的表达被成功上调和下调 ( $P$  均 < 0.01, 图 2B、2C)。

2.3 circSP3 对 HCC 细胞增殖的影响 如图 3 所示, 转染 circSP3 过表达质粒的 Hep-3B 细胞增殖活性较对照细胞升高, 在转染 48、72 h 时差异均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05), 而转染了 circSP3 干扰质粒的 Huh-7 细胞的增殖活性较对照细胞降低, 在转染 48、72 h 时差异亦均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05)。

2.4 circSP3 对 HCC 细胞侵袭、迁移的影响 如图 4A、4B 所示, 与对照组相比, circSP3 过表达组穿过小室的细胞数增多 ( $P$  < 0.01), circSP3 干扰组穿过小室的细胞数减少 ( $P$  < 0.01), 表明 circSP3 表达能够促进 HCC 细胞的侵袭能力。如图 4C、4D 所示, circSP3 表达亦能够促进 HCC 细胞的迁移能力 ( $P$  < 0.01)。

2.5 circSP3 调节 EMT 相关蛋白波形蛋白、E-钙黏蛋白表达 如图 5 所示, 与对照组相比, circSP3 过表达组 Hep-3B 细胞中波形蛋白的表达水平升高 ( $P$  < 0.01), E-钙黏蛋白表达水平降低 ( $P$  < 0.01); circSP3 干扰组 Huh-7 细胞中波形蛋白的表达水平降低 ( $P$  < 0.01), E-钙黏蛋白表达水平升高 ( $P$  < 0.01)。这些结果表明, circSP3 表达能促进 EMT 过程。

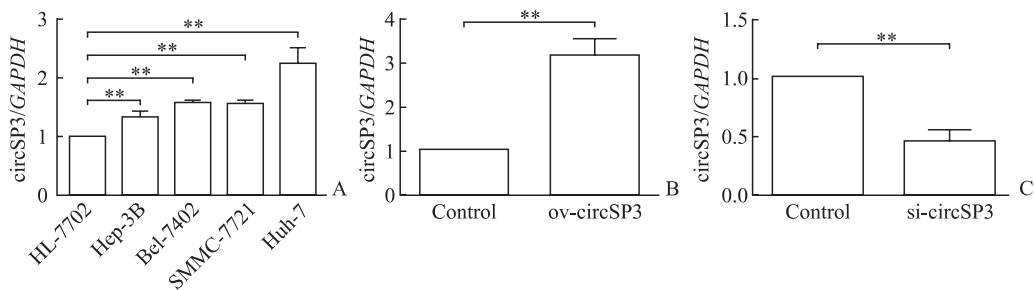


图 2 实时定量 PCR 检测各 HCC 细胞中 circSP3 表达及转染 ov-circSP3 和 si-circSP3 质粒后 circSP3 表达

**Fig 2 Expression of circSP3 in HCC cells after transfection with ov-circSP3 and si-circSP3 plasmids detected by real-time quantitative PCR**

A: The expression of circSP3 in human HCC cell lines (Huh-7, Hep-3B, SMMC-7721 and Bel-7402) and human normal liver cell line (HL-7702); B: The expression of circSP3 in Hep-3B cells transfected with circSP3 overexpression plasmids (ov-circSP3) or empty plasmids (control); C: The expression of circSP3 in Huh-7 cells transfected with circSP3 interference plasmids (si-circSP3) or empty plasmids (control). HCC: Hepatocellular carcinoma; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.  $**P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

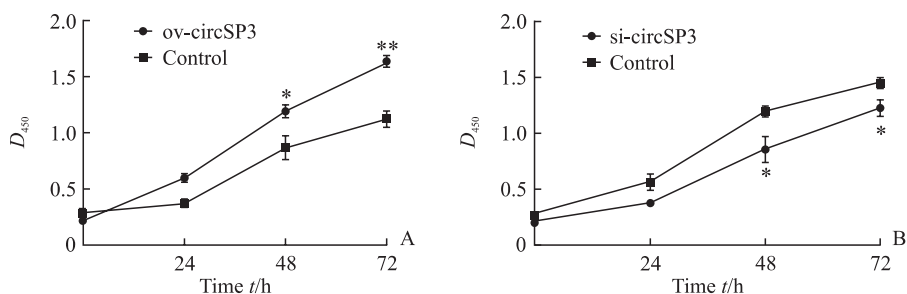


图3 CCK-8法检测 circSP3对HCC细胞增殖能力的影响

Fig 3 Effect of circSP3 on proliferation of HCC cells detected by CCK-8 method

A: The proliferation of Hep-3B cells transfected with circSP3 overexpression plasmids (ov-circSP3) or empty plasmids (control); B: The proliferation of Huh-7 cells transfected with circSP3 interference plasmids (si-circSP3) or empty plasmids (control). CCK-8: Cell counting kit-8; HCC: Hepatocellular carcinoma. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group at same time point.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

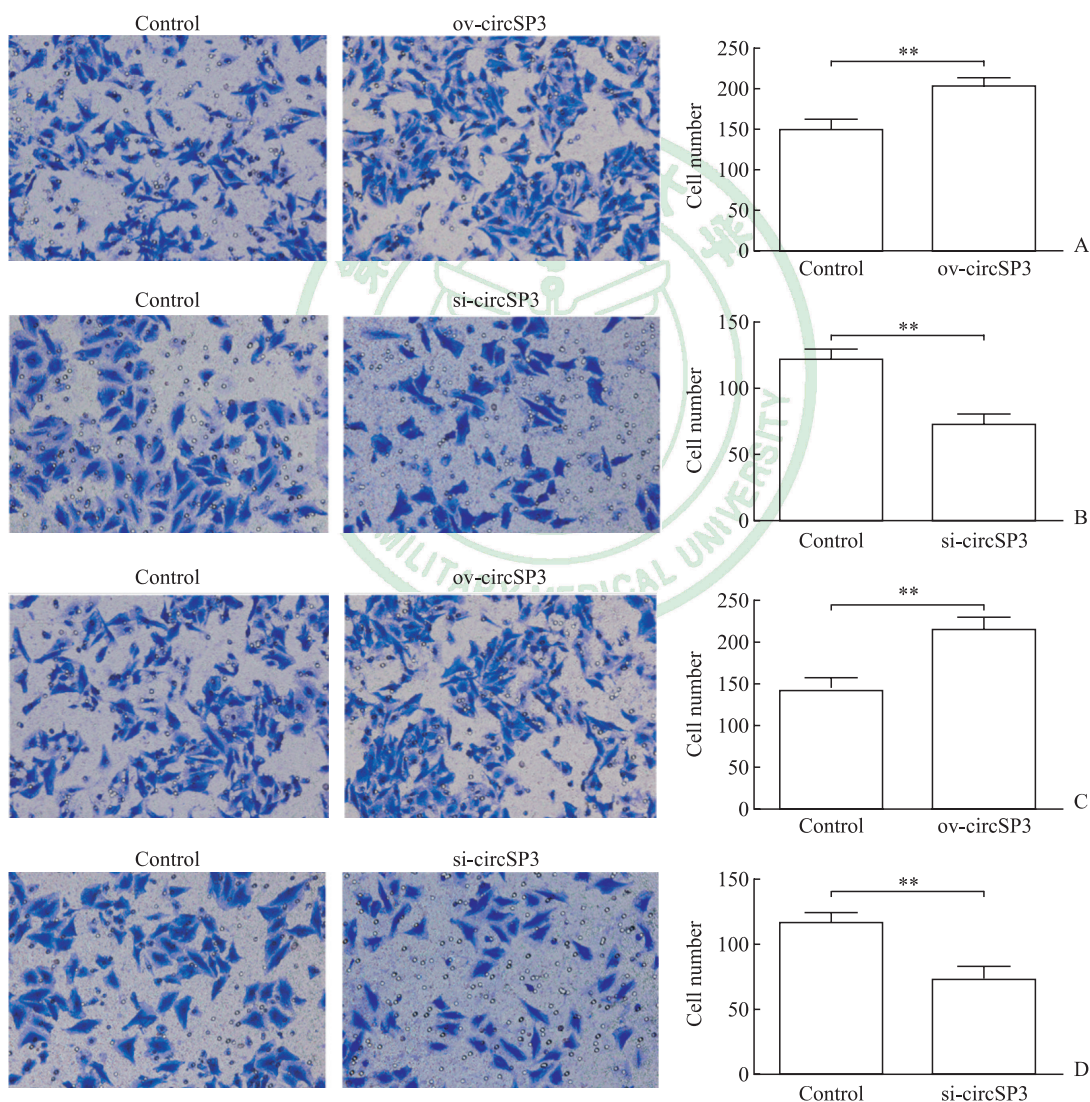


图4 Transwell法检测 circSP3对HCC细胞侵袭、迁移的影响

Fig 4 Effect of circSP3 on invasion and migration of HCC cells detected by Transwell assay

A: The invasion of Hep-3B cells transfected with circSP3 overexpression plasmids (ov-circSP3) or empty plasmids (control); B: The invasion of Huh-7 cells transfected with circSP3 interference plasmids (si-circSP3) or empty plasmids (control); C: The migration of Hep-3B cells transfected with ov-circSP3 or control plasmids; D: The migration of Huh-7 cells transfected with si-circSP3 or control plasmids. HCC: Hepatocellular carcinoma. Original magnification:  $\times 20$ . \*\* $P < 0.01$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

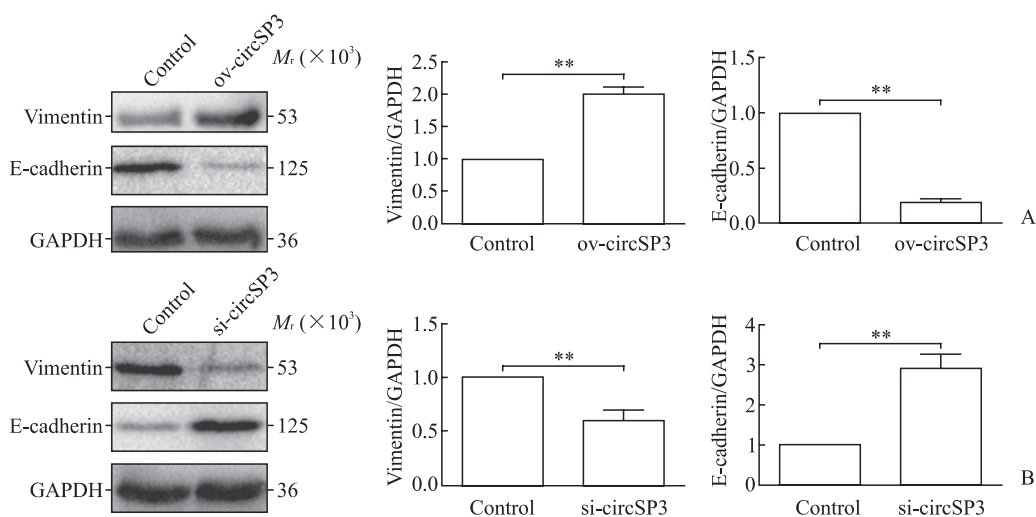


图 5 蛋白质印迹法检测 circSP3 对 HCC 细胞中 EMT 相关蛋白波形蛋白和 E-钙黏蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of circSP3 on expression of EMT-related proteins vimentin and E-cadherin in HCC cells detected by Western blotting

A: The protein expression in Hep-3B cells transfected with circSP3 overexpression plasmids (ov-circSP3) or empty plasmids (control); B: The protein expression in Huh-7 cells transfected with circSP3 interference plasmids (si-circSP3) or empty plasmids (control). HCC: Hepatocellular carcinoma; EMT: Epithelial-mesenchymal transformation; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \*\* $P < 0.01$ .  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

circRNA 是一类新的非编码 RNA 成员, 包括外显子 circRNA、内含子 circRNA 和外显子-内含子 circRNA<sup>[13-14]</sup>。与已知的线性 RNA 不同, circRNA 是封闭的共价结合连续环结构, 既不具有 5'-3' 极性又不具有多聚腺苷酸尾, 这阻止了它们被 RNA 外切核酸酶或 RNA 酶 R 降解<sup>[15]</sup>。因此, circRNA 比线性 mRNA 更稳定, 这使得它们比来自相同基因的典型线性转录本更丰富<sup>[6]</sup>。此外, circRNA 能够在转录或转录后水平调节基因表达。

外显子 circRNA 组成大部分的 circRNA, 主要存在于细胞质, 并可能作为 miRNA 海绵而发挥作用; 而内含子 circRNA 和外显子-内含子 circRNA 在细胞核中含量更丰富, 并可能调控基因转录和转录后水平<sup>[13,16-17]</sup>。此外, 已有研究发现它们存在于不同的细胞外液中, 包括唾液、血液和尿液<sup>[18]</sup>。这些研究结果提示 circRNA 可能参与不同的生物学过程, 如细胞增殖、侵袭和迁移、凋亡和自噬等。

EMT 是上皮细胞失去极性、经过细胞骨架重塑转变成具有迁移能力的间充质表型的过程。多项研究证实 EMT 是肿瘤侵袭转移的一个重要步骤<sup>[19]</sup>, 且 EMT 被认为是肿瘤转移的标志<sup>[20]</sup>, 可以

增加 HCC 细胞的迁移及侵袭能力<sup>[21]</sup>, 其主要的特征为通过 Wnt 和 Notch 信号通路使 E-钙黏蛋白表达减少、波形蛋白表达增加。

通过 StarBase 数据库分析可以确定 circSP3 (chr2: 174819600-174820960) 来自于 SP3 基因座中的外显子区域, 由 5 个外显子成环组成, 该区域位于 2q31.1 号染色体上。本研究结果显示, 与正常肝细胞系相比, circSP3 表达在 4 种 HCC 细胞中均上调。同时, 在 42 例 HCC 患者中, 癌组织中 circSP3 表达高于癌旁组织, 并且具有更高 TNM 分期或更大肿瘤 ( $\geq 5$  cm) 的患者 circSP3 表达水平更高, 说明 circSP3 与 HCC 密切相关, 并有作为诊断 HCC 生物标志物的潜力。本研究结果显示, circSP3 过表达能够促进 HCC 细胞增殖, 干扰 circSP3 表达则可抑制 HCC 细胞的增殖; 并且 circSP3 过表达能促进 HCC 细胞的侵袭及迁移, 干扰 circSP3 表达能抑制 HCC 细胞的侵袭及迁移。因此 circSP3 可能是促进 HCC 转移的潜在分子标志物。同时, 过表达及干扰 circSP3 表达后检测 EMT 相关蛋白 E-钙黏蛋白、波形蛋白的表达量变化, 证明 circSP3 表达能促进 EMT 进程。上述结果提示 circSP3 可能通过促进 EMT 进程而促进 HCC 细胞的迁移和侵袭, 在 HCC 进展中发挥重要作用。

## [参考文献]

- [1] KHATTAB M, FOUAD M, AHMED E. Role of biomarkers in the prediction and diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2015, 7: 2474-2481.
- [2] CALDWELL S, PARK S H. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology[J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(Suppl 19): 96-101.
- [3] LLOVET J M, ZUCMAN-ROSSI J, PIKARSKY E, SANGRO B, SCHWARTZ M, SHERMAN M, et al. Hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16018. doi: 10.1038/nrdp.2016.18.
- [4] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.
- [5] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, BRAMSEN J B, FINSEN B, DAMGAARD C K, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495: 384-388.
- [6] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, SLEVIN M K, BURD C E, LIU J, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19: 141-157.
- [7] QIU L P, WU Y H, YU X F, TANG Q, CHEN L, CHEN K P. The emerging role of circular RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9: 1548-1559.
- [8] HAN D, LI J, WANG H, SU X, HOU J, GU Y, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. *Hepatology*, 2017, 66: 1151-1164.
- [9] HUANG X Y, HUANG Z L, XU Y H, ZHENG Q, CHEN Z, SONG W, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-100338/miR-141-3p pathway in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5428. doi: 10.1038/s41598-017-05432-8.
- [10] CHEN G, SHI Y, LIU M, SUN J. CircHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 175. doi: 10.1038/s41419-017-0204-3.
- [11] XU L, FENG X, HAO X, WANG P, ZHANG Y, ZHENG X, et al. CircSETD3 (Hsa\_circ\_0000567) acts as a sponge for microRNA-421 inhibiting hepatocellular carcinoma growth[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 98. doi: 10.1186/s13046-019-1041-2.
- [12] WESSELHOEFT R A, KOWALSKI P S, ANDERSON D G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2629. doi: 10.1038/s41467-018-05096-6.
- [13] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, WANG P L, BORWN P O. Cell-type specific features of circular RNA expression[J/OL]. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003777. doi: 10.1371/journal.pgen.1003777.
- [14] ZHANG Y, ZHANG X O, CHEN T, XIANG J F, YIN Q F, XING Y H, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51: 792-806.
- [15] SUZUKI H, TSUKAHARA T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 9331-9342.
- [16] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, TORTI F, KRUEGER J, RYBAK A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495: 333-338.
- [17] YU B, SHAN G. Functions of long noncoding RNAs in the nucleus[J]. *Nucleus*, 2016, 7: 155-166.
- [18] QU S, YANG X, LI X, WANG J, GAO Y, SHANG R, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365: 141-148.
- [19] MICALIZZI D S, FARABAUGH S M, FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15: 117-134.
- [20] KSIĄŻKIEWICZ M, MARKIEWICZ A, ZACZEK A J. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells[J]. *Pathobiology*, 2012, 79: 195-208.
- [21] REICHL P, HAIDER C, GRUBINGER M, MIKULITS W. TGF- $\beta$  in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18: 4135-4147.

[本文编辑] 尹 茶