

circRNA是作为miRNA的海绵起调控作用

作者：writer 来源：本站

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/330.html>

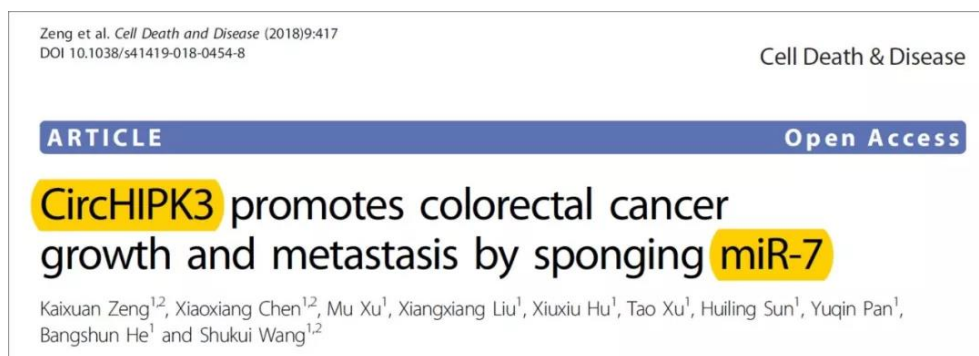
本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

这是首次提出并证实circRNA是作为miRNA的海绵起调控作用，自此circRNA相关研究快速增长，逐渐成为非编码RNA领域最火热的明星分子。

1.miRNA分子海绵，circRNA含有大量的miRNA结合位点，具有miRNA海绵作用，进而间接调控miRNA下游靶基因的表达。

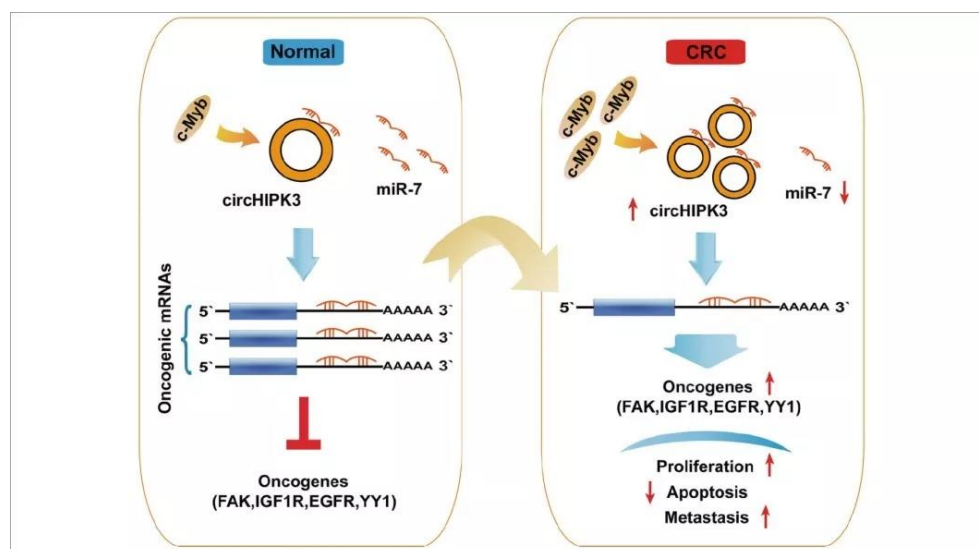
2.调控基因转录，circRNA也可以通过与RNA结合蛋白的结合来调控蛋白功能，比如通过与转录因子的结合来抑制基因的转录。

3.编码功能，circRNA虽然属于非编码RNA，但是也有部分circRNA可以编码多肽，通过该多肽行使调控功能。



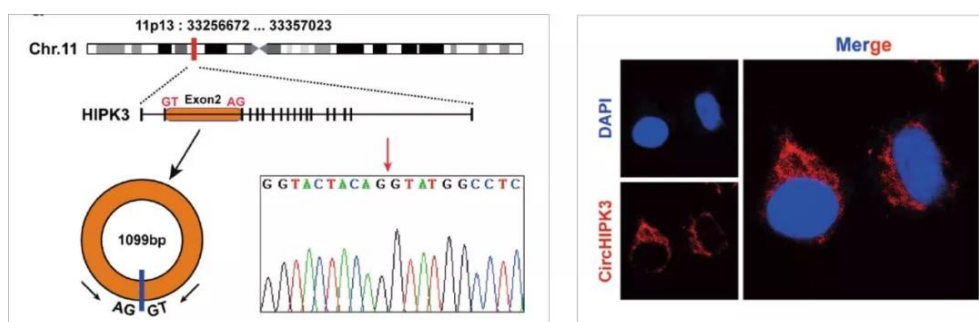
结肠直肠癌(CRC)是全球第三大最常见的恶性疾病，也是导致癌症相关死亡的第四大原因。因此，发现用于预后预测的新潜在生物标志物并深入阐明CRC恶性肿瘤的确切分子机制可能改善CRC患者的治疗。

circRNA与人类疾病尤其是癌症密切相关，由于其丰富性和稳定性，它们可能成为更好的生物标志物。circHIPK3是一种特别丰富的circRNA，已被证实参与代谢失调和肿瘤发生。

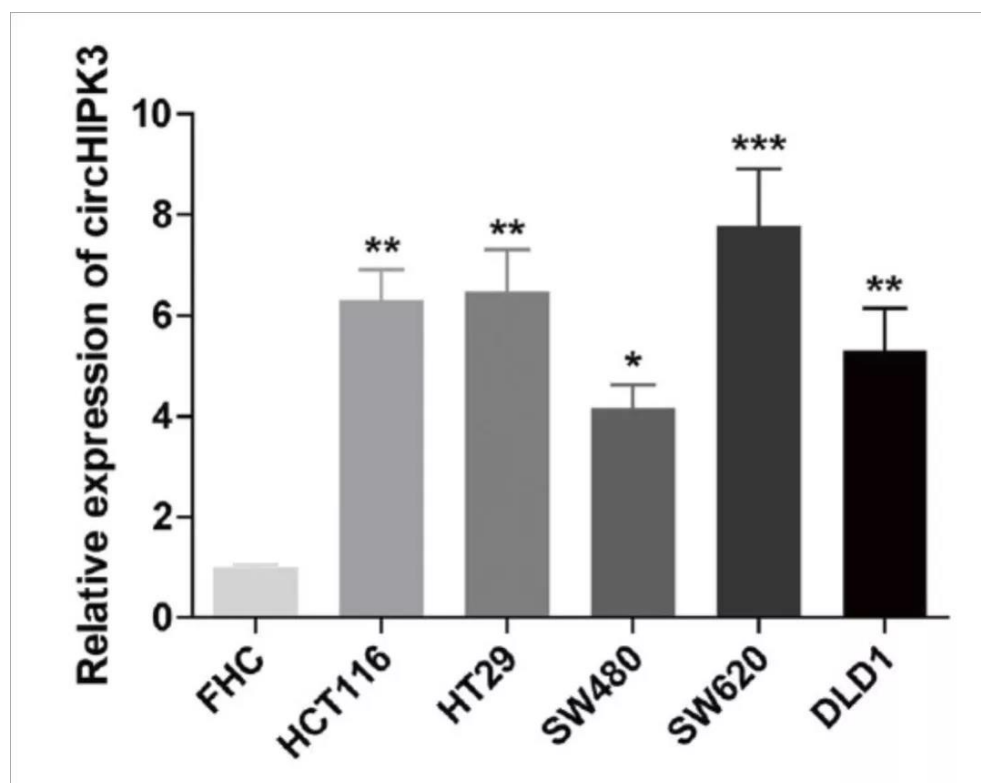


c-Myb作为转录因子，促进circHIPK3的表达，吸附miR-7，从而降低miR-7对癌基因的抑制作用，进而促进结直肠癌的发展和转移。

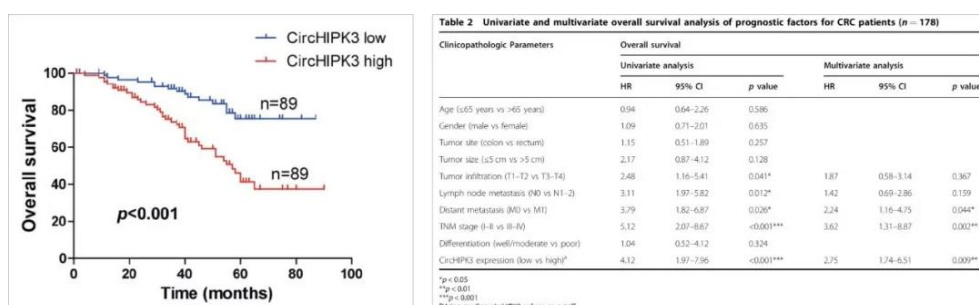
1、circHIPK3在CRC中有明显的表达上调，而circHIPK3表达的增加预示着预后不良。



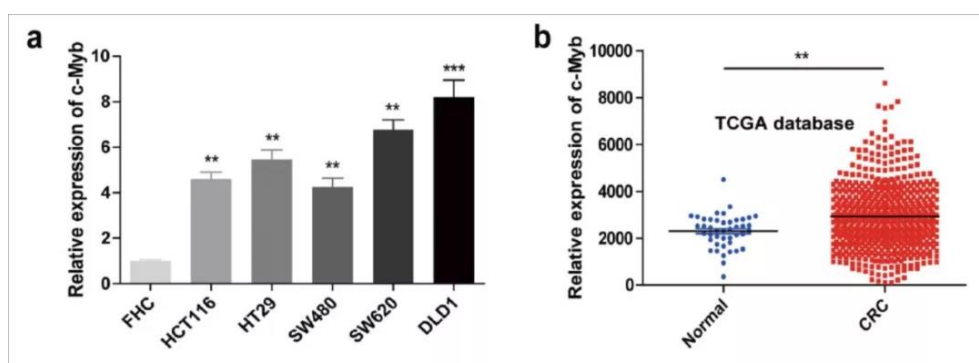
接下来，我们研究了circHIPK3在CRC细胞系和组织中的表达水平。与正常结肠粘膜上皮细胞(FHC)相比，circHIPK3在CRC细胞系(HCT116, HT29, SW480, SW620, DLD1)中的表达显著上调(图4)。



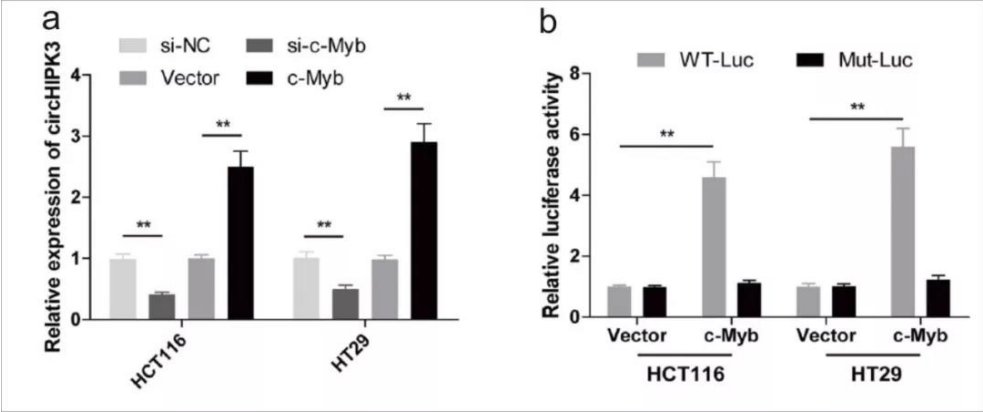
通过分析Kaplan-Meier生存曲线($p < 0.001$), circHIPK3高表达的CRC患者的总体存活显著低于circHIPK3低表达的患者(图5左)。进一步的Cox多因素生存分析显示, circHIPK3的高表达是CRC患者生存差的独立预后因素(图5右)。这些结果表明circHIPK3上调作为CRC发展的早期事件并且在CRC进展中具有重要作用。



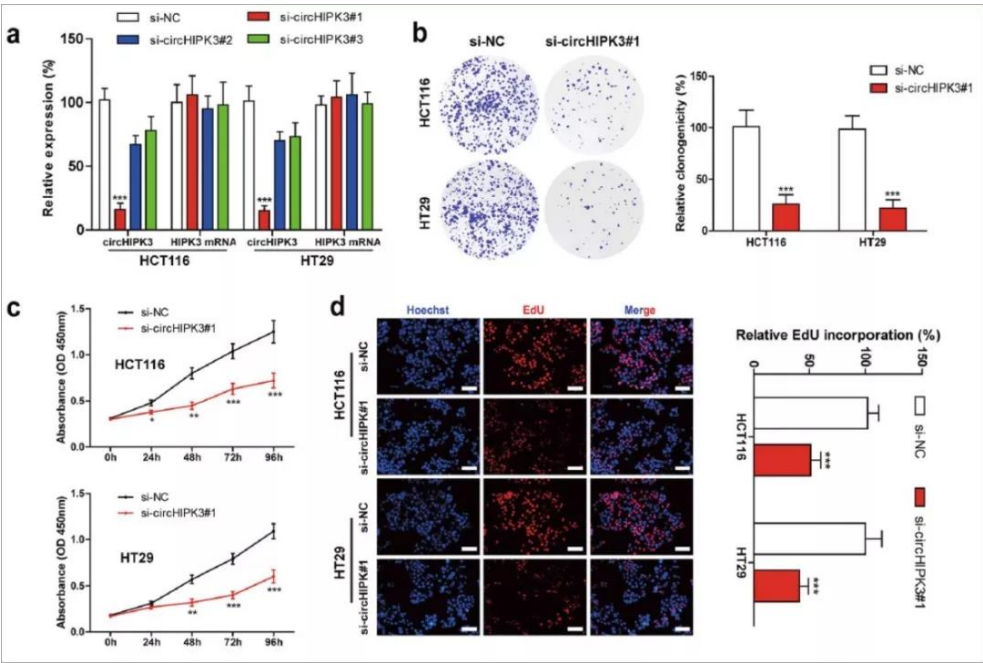
之前有研究显示在糖尿病患者中c-Myb促进circHIPK3的转录而使其富集。我们发现c-Myb在CRC细胞系(图6a)和组织(TCGA数据库)(图6b)中显著过表达, 这与以前的研究一致。



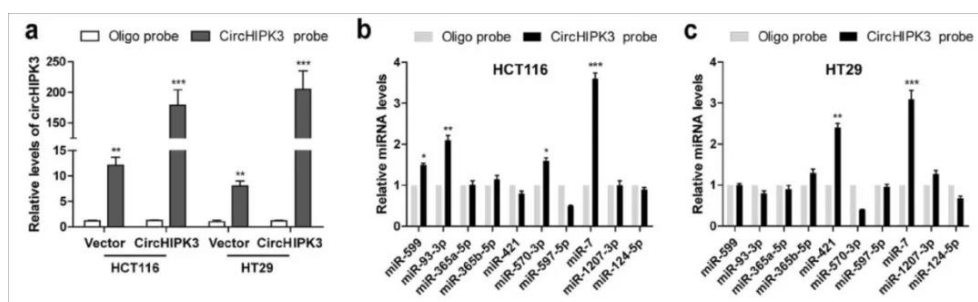
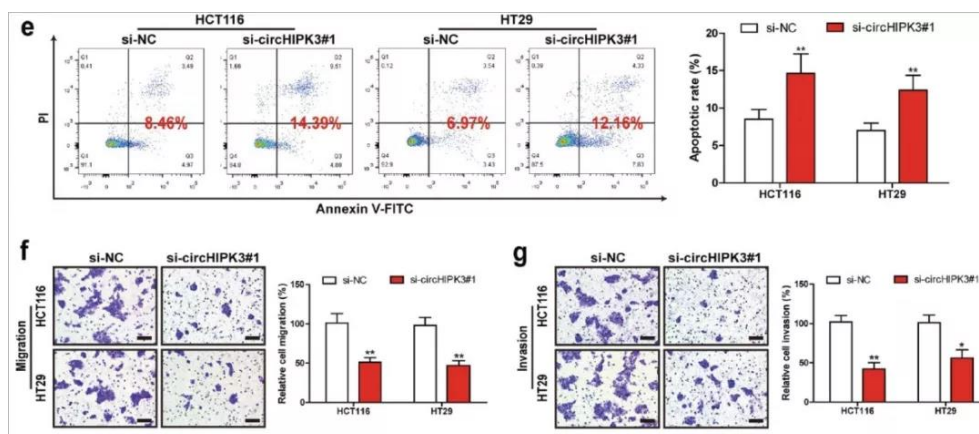
在HCT116和HT29细胞系中使用siRNA敲低c-Myb的表达，circHIPK3表达显著降低;过表达c-Myb，则circHIPK3表达显著增加(图7a)。荧光素酶报告基因检测显示c-Myb过表达显著增强了circHIPK3启动子中含有c-myb位点的载体的荧光素酶活性，而突变型c-Myb结合位点的荧光素酶活性未受影响(图7b)。以及ChIP实验，进一步表明c-Myb通过直接结合circHIPK3启动子区域来增加circHIPK3的表达。



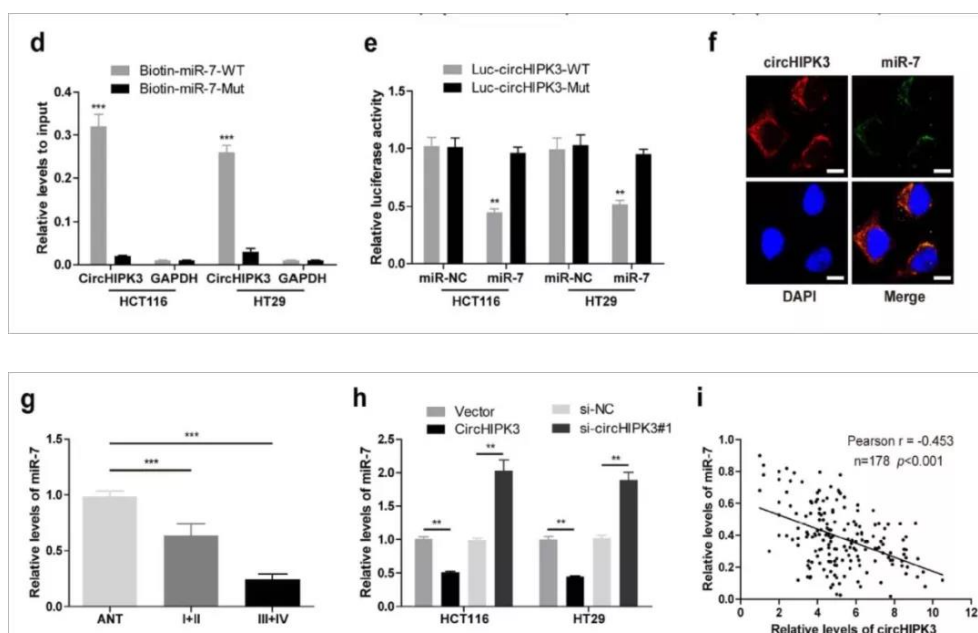
为了研究circHIPK3在CRC中的生物学功能，使用siRNA针对circHIPK3的连接位点以沉默HCT116和HT29细胞系中的circHIPK3表达。这些siRNA显著降低circHIPK3表达水平，但对其线性异构体没有影响(图8a)。克隆形成实验显示circHIPK3敲低显著抑制HCT116和HT29细胞系的克隆形成能力(图8b)。通过CCK8实验(图8c)和EdU测定(图8d)测量细胞增殖，显示沉默circHIPK3会显著抑制这两种细胞系中的细胞增殖。



si-circHIPK3组中，存在更多的凋亡细胞(图9e)。circHIPK3沉默显著阻碍HCT116和HT29细胞迁移(图9f)和侵袭(图9g)。这些数据共同表明circHIPK3的沉默可以延缓CRC细胞的进展。

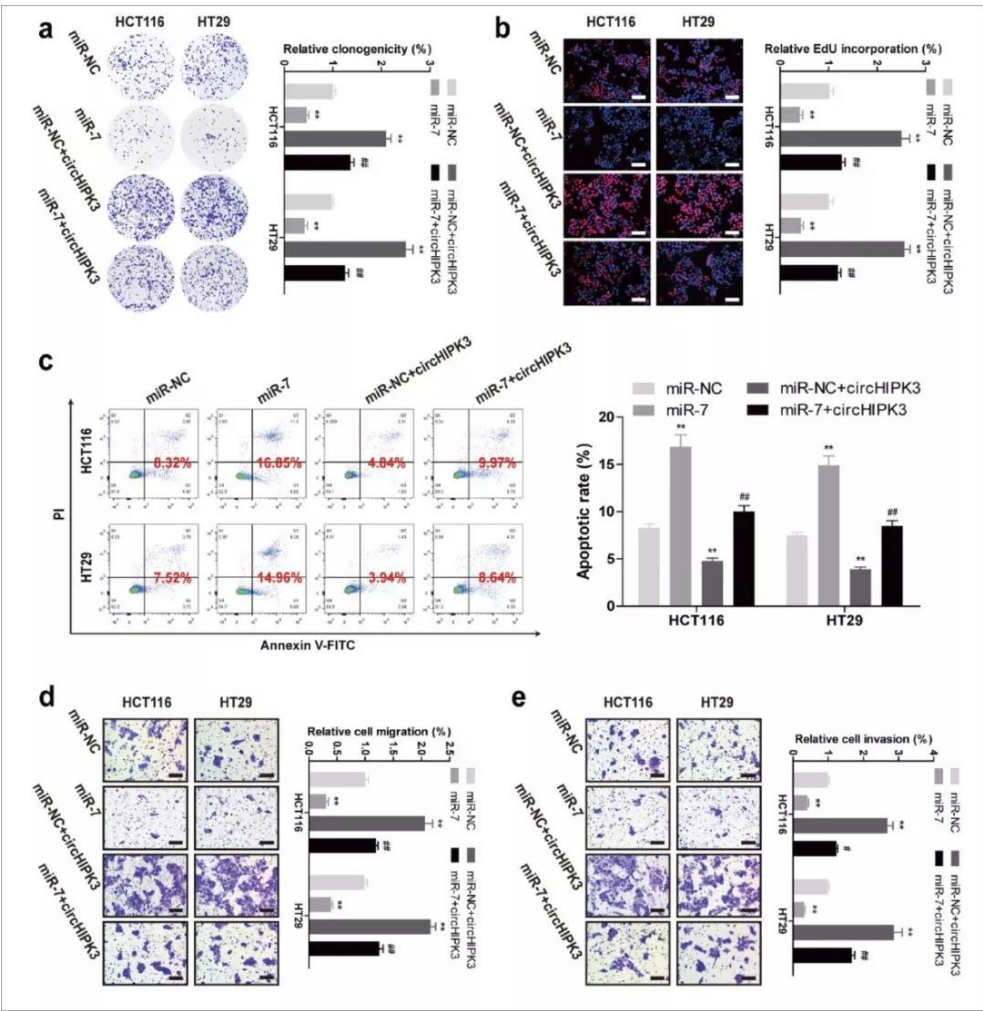


利用生物素标记的miR-7及其突变模拟物在过表达circHIPK3的HCT116和HT29细胞中pull down circHIPK3，结果显示野生型miR-7捕获更多circHIPK3(图11d)。萤光素酶报告基因检测证明miR-7的过表达显著降低含有完整circHIPK3序列的萤光素酶活性，但不影响HCT116和HT29细胞中具有突变型miR-7结合位点的萤光素酶活性(图11e)。FISH实验结果显示circHIPK3和miR-7共定位在细胞质中(图11f)。

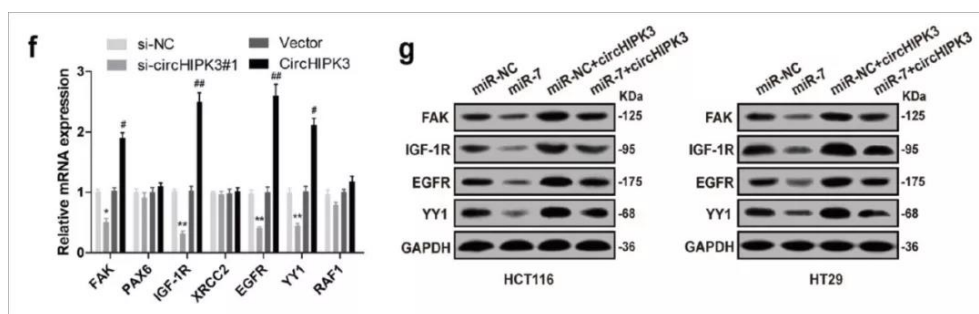


miR-7是一种众所周知的肿瘤抑制因子，参与许多人类肿瘤的发展和进展。miR-7的过表达显著抑制了CRC细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡(图13)。circHIPK3质粒和miR-7模拟物共转染的CRC细胞比仅用miR-7模拟物转染CRC细胞出现更多克隆(图13a)。

与单独的miR-7过表达相比，过表达miR-7与circHIPK3一起促进CRC细胞增殖(图13b)。miR7 + circHIPK3组与单独miR7组相比凋亡细胞较少(图13c)。与单独miR-7过表达相比，miR-7和circHIPK3过表达阻碍HCT116和HT29细胞迁移(图13d)和侵袭(图13e)。与miR-7过表达或circHIPK3沉默相比，miR-7的过度表达与circHIPK3的敲低相结合显示出对CRC细胞恶性表型更强的抑制作用。

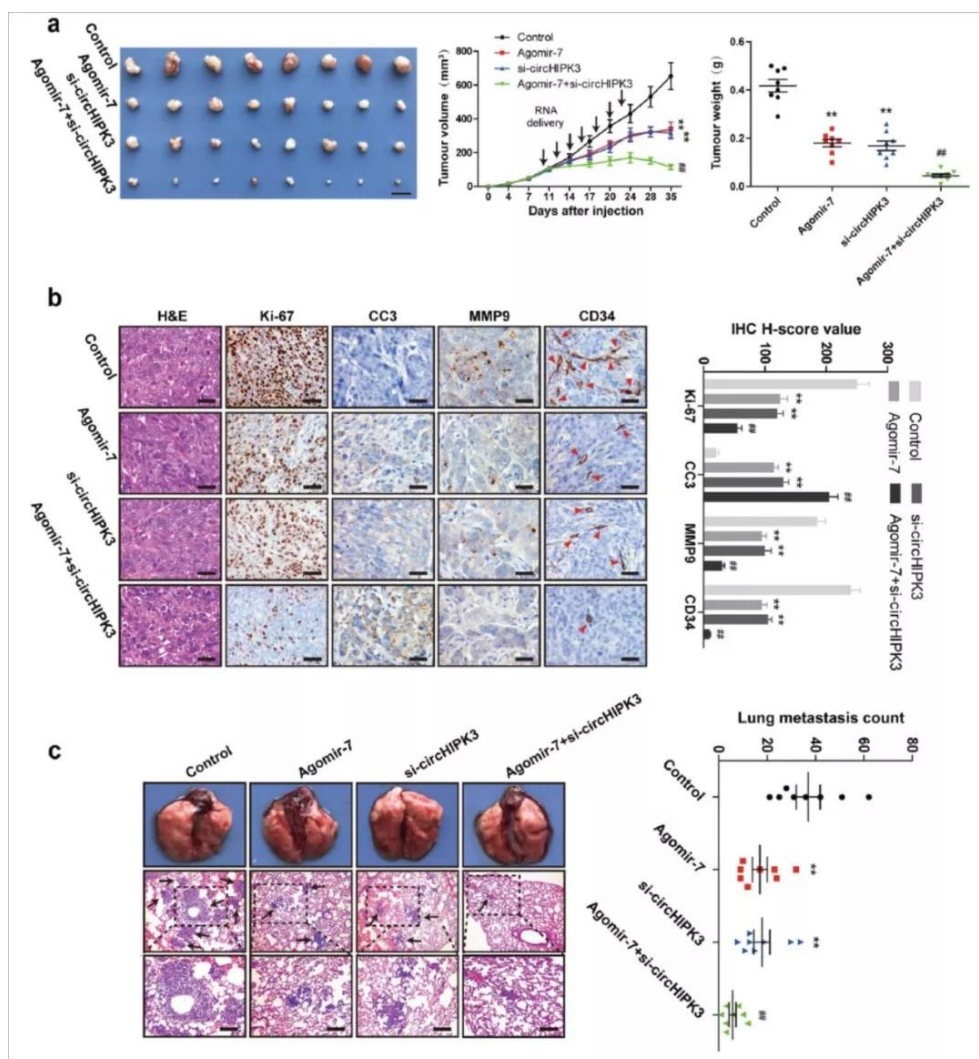


为证实circHIPK3是否通过提高miR-7靶标的癌基因的的表达来发挥促肿瘤作用，选择一组与生长和转移相关的miR-7靶基因做qRT-PCR分析，结果显示circHIPK3的过表达会增加FAK，IGF1R，EGFR和YY1的表达，circHIPK3的敲低会降低FAK，IGF1R，EGFR和YY1的表达(图14f)。与仅用miR-7模拟物转染的细胞相比，在用miR-7模拟物和circHIPK3载体共转染的CRC细胞(HCT116和HT29)中FAK，IGF1R，EGFR和YY1的表达显着增加(图14g)。上述结果表明circHIPK3的过表达通过提高miR-7并随后促进FAK，IGF1R，EGFR和YY1表达，从而有效地逆转了miR-7造成的CRC细胞侵袭性减弱。



为了进一步评估circHIPK3是否在体内发挥肿瘤促进作用，通过皮下注射等量的HCT116细胞(每组n = 8)建立了异种移植小鼠模型。约10天后，当肿瘤体积达到约100mm³时，单独si-circHIPK3，单独agomir-7或两者联合，均每两天瘤内注射连续两周时间。agomir-7或si-circHIPK3的肿瘤内注射分别显著降低肿瘤体积和重量。更重要的是，联合si-circHIPK3和agomir-7组比si-circHIPK3或agomir-7单独显示更小的肿瘤体积和重量(图15a)。同样，在mRNA和蛋白水平，miR-7过表达或circHIPK3敲低均显著降低miR-7靶向的原癌基因(FAK, IGF1R, EGFR, YY1)的表达，并且联合组表现出这些癌基因的较低表达。分析还显示与si-circHIPK3或agomir-7组相比，si-circHIPK3 + agomir-7组中Ki67，MMP9阳性细胞和微血管密度降低以及半胱天冬酶-3阳性细胞增加(图15b)。

通过尾静脉注射HCT116细胞到裸鼠中建立了转移模型(每组n = 8)。在对照组中观察到平均每只小鼠38个肺转移性结节，在agomir-7或si-circHIPK3组中分别观察到17和19个，而在联合si-circHIPK3和 agomir-7组仅有6个转移(图15c)。这些数据表明circHIPK3的沉默会抑制CRC生长和体内转移，并且与miR-7过度表达结合显示出对肿瘤抑制的累加效应。



这篇circRNA研究文章，做的是经典的miRNA海绵作用的研究思路，而且用了明星分子miR7，依然发了6分的文章。不过不得不说，文章的工作量比较大，做了很多实验，而且整体思路非常严谨。

更多科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发