

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.21.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210920.0506.004.html\(2021-09-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210920.0506.004.html(2021-09-23))

## 肝癌细胞来源的外泌体作用正常肝细胞后 差异表达环状 RNA 的筛选\*

沈彩红<sup>1</sup>, 孙 林<sup>2</sup>, 黄文杰<sup>2</sup>, 沈永奇<sup>3</sup>, 卢永刚<sup>4</sup>, 孙一帆<sup>2△</sup>

(广西医科大学附属柳州中心医院:1. 感染科;2. 检验科;3. 肿瘤科;4. 肝胆外科, 广西柳州 545007)

**[摘要]** **目的** 筛选肝癌 HepG2 细胞外泌体处理 LO2 细胞后差异表达的环状 RNA(circRNA), 并通过生物信息学预测分析其可能在肝癌发生、发展中的作用。**方法** 收集经 HepG2 细胞外泌体共同培养后的 LO2 细胞和正常培养的 LO2 细胞样本, 采用 Arraystar Human circRNA Arrays V2 芯片检测、筛选差异表达的 circRNA; 进行聚类分析筛选明显差异表达的 circRNA, 并用实时荧光定量聚合酶链反应方法进行初步验证。筛选获得的 circRNA 利用基因本体论和京都基因与基因组百科全书分别进行基因功能注释分析及信号通路富集分析。**结果** 经 HepG2 细胞外泌体处理的 LO2 细胞与正常培养的 LO2 细胞比较, 以差异表达倍数(FC) > 2 且  $P < 0.05$  为筛选标准, 筛选出 235 个差异表达的 circRNA, 其中 50 个 circRNA 上调表达, 185 个 circRNA 下调表达。经生物信息学分析, 筛选出 5 个明显上调的 circRNA(hsa\_circRNA\_0010044、hsa\_circRNA\_009012、hsa\_circRNA\_101016、hsa\_circRNA\_100917、hsa\_circRNA\_007918) 和 5 个明显下调的 circRNA(hsa\_circRNA\_002082、hsa\_circRNA\_103128、hsa\_circRNA\_092388、hsa\_circRNA\_007343、hsa\_circRNA\_071935)。这些 circRNA 经 HepG2 细胞外泌体处理后的 LO2 细胞中的表达水平与筛选结果一致。被富集的宿主基因主要参与蛋白质结合、细胞周期、转录调节、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。**结论** 筛选出 5 个明显上调和 5 个明显下调与肝癌发生、发展相关的 circRNA。

**[关键词]** 肝肿瘤; 外泌体; circRNA; 生物标志物

**[中图法分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)21-3606-06

## Screening of differentially expressed circRNAs after exosomes derived from hepatocellular carcinoma cells treating normal hepatocyte\*

SHEN Caihong<sup>1</sup>, SUN Lin<sup>2</sup>, HUANG Wenjie<sup>2</sup>, SHEN Yongqi<sup>3</sup>, LU Yonggang<sup>4</sup>, SUN Yifan<sup>2</sup>

(1. Department of Infection; 2. Department of Clinical Laboratory; 3. Department of Oncology; 4. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Liutie Central Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545007, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen out the differentially expressed circRNA after hepatocellular carcinoma (HCC) HepG2 cells derived exosomes treating LO2 cells, and to predict and analyze its role in the occurrence and development of HCC by bioinformatics. **Methods** The LO2 cells co-cultured with HepG2 cells exosomes and normally cultured LO2 cells samples were collected. The differentially expressed circRNA was detected and screened by Arraystar Human circRNA Arrays V2 chip. The clustering analysis was performed, significantly differentially expressed circRNA was screened, its preliminary verification was conducted by the real-time fluorescence quantitative PCR method. circRNA obtained by screening used the gene ontology and Kyoto encyclopedia of genes and genomes to conduct the gene functional annotation analysis and signal pathway enrichment analysis respectively. **Results** In the comparison LO2 cells treated by HepG2 cells exosome and normally cultured LO2 cells, with the differential expression fold (FC) > 2, moreover  $P < 0.05$  as the screening standard, 235 differentially expressed circRNA were screened out, in which, 50 circRNAs were up-regulated and 180 circRNAs were down-regulated. After the bioinformatics analysis, 5 significantly up-regulated circRNAs (hsa\_circRNA\_0010044, hsa\_circRNA\_009012, hsa\_circRNA\_101016, hsa\_circRNA\_100917, hsa\_circRNA\_007918) and 5 significantly down-regulated circRNAs (hsa\_circRNA\_002082, hsa\_circRNA\_103128, hsa\_circRNA\_092388, hsa\_circRNA\_007343, hsa\_circRNA\_071935) were identified. The expression levels of these circRNAs in LO2 cells treated with HepG2 cells exosomes were consistent with the screening results. The enriched host genes were mainly involved in protein binding, cell cycle, transcription regulation, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, etc. **Conclusion** Five significantly up-regulated and five significantly down-regulated circRNAs related to the occurrence and development of HCC were screened out.

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81760501); 广西壮族自治区自然科学基金项目(2018GXNSFAA294029, 2017GXNSFAA198041); 广西壮族自治区柳州市科技计划项目(2018DH10504, 2018BJ10506, 2019BJ10612)。 作者简介: 沈彩红(1972—), 副主任医师, 本科, 主要从事肝脏疾病的研究。 △ 通信作者, E-mail: sunyifan13@126.com。

RNA\_092388, hsa\_circRNA\_007343, hsa\_circRNA\_071935) were screened out. The circRNA expression levels in LO cells after treating by HepG2 cell exosome were consistent with the screening results. The enriched host genes were mainly involved in protein binding, cell cycle, transcription regulation and MAPK signaling pathway. **Conclusion** The five significantly up-regulated and down-regulated circRNAs are screened out, which are associated with the occurrence and development of HCC.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; exosomes; circRNA; biomarker

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其在肿瘤中的发病率位列第 4,病死率位列第 3<sup>[1]</sup>。肝癌具有较高的发病率和病死率,急切需要有效的早期诊断。目前,肝癌早期诊断较为理想的血清标志物为甲胎蛋白,但由于其特异度不高,故亟待探索其他有助于肝癌早期有效诊断的生物标志物。近年来,外泌体在肿瘤疾病中的作用已成为研究热点之一。外泌体中含大量核酸、蛋白、脂质等物质,参与了细胞之间或细胞与组织间的通讯,影响肿瘤的发生、发展。环状 RNA (circRNA) 作为外泌体内含物中的一种核酸,随着 RNA 测序技术的迅速发展,大量 circRNA 被发现与肿瘤的发生存在潜在的关联,发挥了重要的调控作用,具有巨大潜力,因此,其有可能成为肝癌早期筛查的一种新型生物标志物<sup>[2]</sup>。本研究通过对肝癌 HepG2 细胞外泌体与正常肝细胞 LO2 共同培养后 circRNA 表达进行比较,筛选验证了具有差异表达的 circRNA,并

预测分析了其在肝癌发展的作用,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

外泌体提取试剂盒(美国 Thermo 公司)、总 RNA 提取试剂盒(美国 Qiagen 公司)、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)、Arraystar Super RNA Labeling Kit(美国 Arraystar 公司)、Arraystar Human circRNA Arrays V2(美国 Arraystar 公司)、SYBRGreen 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒(美国 Thermo 公司)、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司)、AB7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)、低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司)、Agilent Hybridization Oven、Agilent Scanner G2505C、Nanodrop ND-1000 等。实时荧光定量 PCR 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应引物

产物名称	方向	引物序列(5'-3')
hsa_circRNA_0010044	正向	GGAGAGTGTGGAAGCCTGG
	反向	CTCCAATGCCTTTCCACTCCT
hsa_circRNA_009012	正向	TGCTTTCTGAAGTCCTGCC
	反向	ACCGCGTGTTCACATTGTA
hsa_circRNA_101016	正向	CTGCTTGCAGGCTTTCAGTC
	反向	CAGCCAGCGCATTACATCAT
hsa_circRNA_100917	正向	TTGCCAAACTCCCACCTAGC
	反向	GGAATGGCATCATCAACAGC
hsa_circRNA_007918	正向	AGATGCGTGGTAACCAGACC
	反向	AGAAGCAATGCCTGAGCCAA
hsa_circRNA_002082	正向	ACCAGATCAGGATTTGAGCGG
	反向	GGCCTCTATTGCCATGTGCC
hsa_circRNA_103128	正向	TGACCAAGCACAAAAGCAAG
	反向	ATCATCTGATGGGGTGGGG
hsa_circRNA_092388	正向	GCTGTAAGTGGCCTGGCTTC
	反向	TGCGGGGCATAGGATAGTCA
hsa_circRNA_007343	正向	GGATACTGACCGCATGAGCA
	反向	CCTCTGGTACTCGATTGGCG
hsa_circRNA_071935	正向	CCGGACGGGACTCTCAAAAA
	反向	ATGTCGTAGTGGTTGGCCTG

## 1.2 方法

### 1.2.1 外泌体提取与鉴定

收集生长良好的 HepG2 细胞培养液至离心管中,4 °C、3 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液至新的离心管加入外泌体提取试剂,4 °C 过夜孵育后再

4 °C、3 000 r/min 离心 60 min,弃上清液,所得沉淀即为外泌体。用无菌 1×磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)重悬外泌体,储存于-80 °C 备用。通过透射电镜扫描和纳米颗粒跟踪分析仪对所提取的外泌体进行鉴定。

### 1.2.2 标本收集与处理

分为对照组(正常肝细胞 LO2)和实验组[正常肝细胞 LO2+HepG2 细胞外泌体(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )]。按照分组对 LO2 细胞进行处理, HepG2 细胞外泌体与 LO2 细胞共培养 48 h 后收集细胞, 加上 Trizol 裂解液, 用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 进行 circRNA 芯片分析。

### 1.2.3 外泌体处理 LO2 细胞后差异表达 circRNA 筛选

选取实验组和对照组标本各 2 份总 RNA, 使用美国 Arraystar 公司的 8x15K 的 Arraystar Human circRNA Arrays V2 芯片在 Agilent Hybridization Oven 仪器上进行 circRNA 杂交检测, 用 Agilent Scanner G2505C 仪器进行扫描获取 circRNA 芯片检测数据。利用 R software limma package, 以  $P < 0.05$  且差异表达倍数(fold change)  $> 2$  的条件筛选差异表达的 circRNA。在筛选差异表达 circRNA 中选择上调和下调差异表达倍数排在前 5 位的 circRNA 进行进一步验证。

### 1.2.4 差异表达的 circRNA 生物信息学分析

通过生物信息学相关数据库对差异表达的 circRNA 进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)信号通路分析, 预测差异表达的 circRNA 相关的生物学功能。

### 1.2.5 实时荧光定量 PCR 验证 circRNA 的表达

使用逆转录试剂盒将提取的细胞总 RNA 逆转录为 cDNA, 按照 SYBRGreen PCR 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 检测筛选得到的上调和下调差异表达前 5 位的 circRNA 相对表达水平。

## 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 外泌体的提取和鉴定

经透射电镜观察, 从 HepG2 细胞培养液中提取到的沉淀物其形态为有圆形或椭圆形脂膜结构的小囊泡, 见图 1A; 颗粒大小为 50~150 nm, 见图 1B。成功从 HepG2 细胞培养液中分离提取到外泌体。

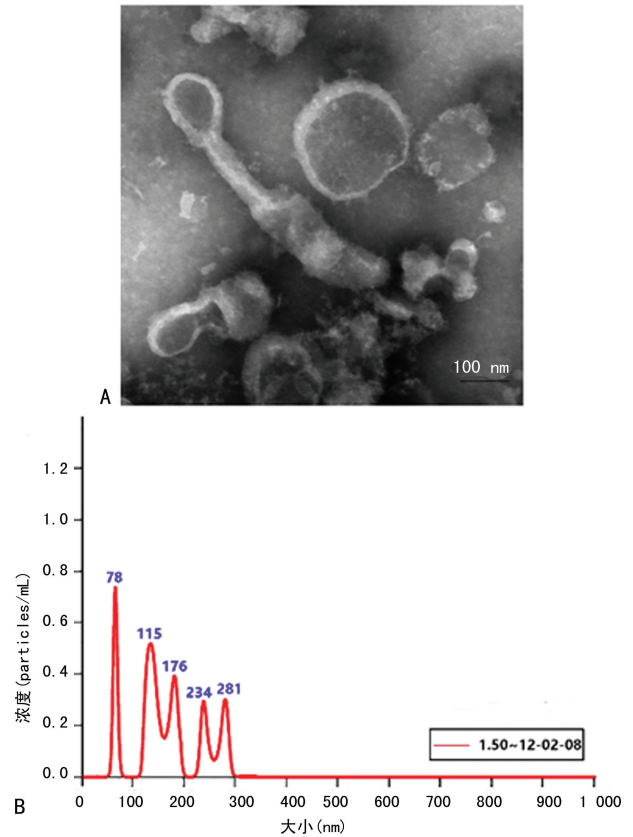
### 2.2 CircRNA 芯片原始数据均一化

CircRNA 芯片原始图像资料采用 Agilent Feature Extraction 软件进行数据提取, 利用 R 语言 limma 软件包依据 Quantile 算法规则对 circRNA 芯片数据进行标准化和均一化处理。经标准化和均一化处理后消除了染色偏差和点样针头带来空间差异引起基因表达量的不同, 对照组和实验组标本 circRNA 表达经标准化后荧光信号强度基本一致, 可进一步进行 circRNA 基因差异表达分析。

### 2.3 芯片数据差异表达基因筛选分析

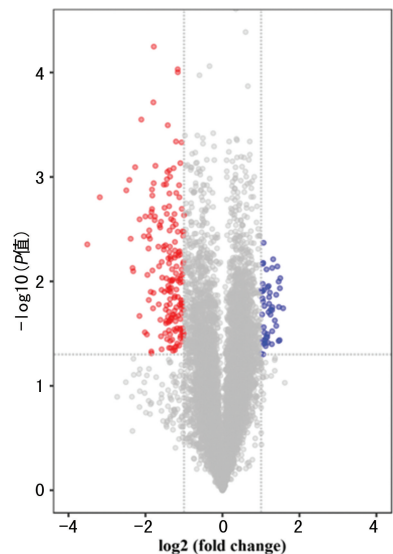
CircRNA 基因芯片在对照组和实验组共培养后

共检测出 10 017 个 circRNA, 为筛选出正常 LO2 细胞和外泌体处理后细胞中差异表达的基因, 以  $\text{FC} > 2$  且  $P < 0.05$  为筛选标准, 筛选出 235 个差异表达的 circRNA, 其中 50 个 circRNA 上调表达, 185 个 circRNA 下调表达; 其中前 10 位明显上调和明显下调的 circRNA 见表 2。根据  $\text{FC} > 2$  且  $P < 0.05$  作为筛选标准绘制火山图, 见图 2。经 HepG2 细胞外泌体处理 LO2 细胞后, circRNA 低表达数量多于高表达数量。



A: 外泌体形态鉴定; B: 外泌体颗粒大小检测。

图 1 HepG2 细胞外泌体鉴定



两侧红点和蓝点: 两组间存在差异表达的 circRNA; 右侧蓝点: 经外泌体处理后 LO2 细胞中上调表达的 circRNA; 左侧红点: 外泌体处理后 LO2 细胞中下调表达的 circRNA。

图 2 差异表达的 circRNA 火山图分析结果

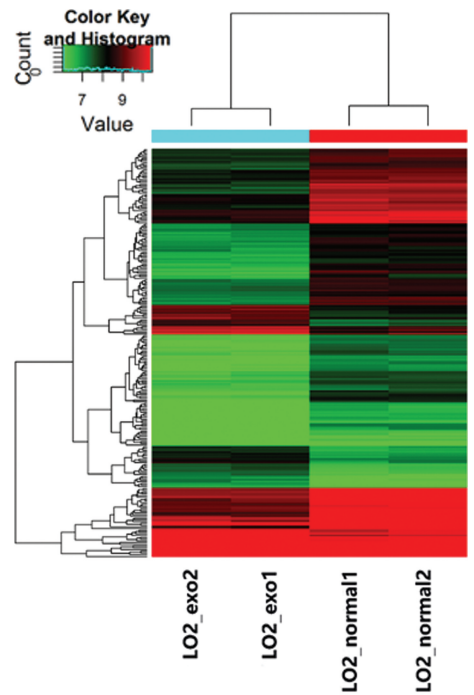
### 2.4 外泌体处理后 LO2 细胞相关 circRNA 的聚类分析

对照组和实验组经筛选获得的 circRNA 表达水平进行聚类分析结果见图 2。差异表达的 circRNA 中 LO2 细胞经外泌体处理后低表达的 circRNA 多于高表达的 circRNA,见图 3。与火山图分析结果一致。

### 2.5 在 LO2 细胞中验证差异表达的 circRNA

根据前面筛选结果挑选出其中表达倍数差异较大的前 5 个表达上调或下调的 circRNA,见表 2。上调表达的 hsa\_circRNA\_0010044、hsa\_circRNA\_009012、hsa\_circRNA\_101016、hsa\_circRNA\_100917、hsa\_circRNA\_007918 和下调表达的 hsa\_circRNA\_002082、hsa\_circRNA\_103128、hsa\_circRNA\_092388、hsa\_circRNA\_007343、hsa\_circRNA\_071935 等 circRNA 在 HepG2 细胞外泌体处理后的 LO2 细胞表达与之前分析结果一致,见图 4。hsa\_circRNA\_0010044、hsa\_circRNA\_009012、hsa\_circRNA\_101016、hsa\_circRNA\_100917、hsa\_circRNA\_007918 等 circRNA 确实在经外泌体处理后的 LO2 细胞中的表达水平明显上调,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); hsa\_circRNA\_002082、hsa\_circRNA\_103128、hsa\_circRNA\_092388、hsa\_circRNA\_007343、hsa\_circRNA\_071935 等 circRNA 确实在经外泌体处理后的 LO2 细胞中的表达水平明显下调,差异有统计学意义 ( $P <$

0.05),与之前生物信息学预测分析结果一致。



纵轴:基因聚类;横轴:标本聚类;绿色:该基因在经外泌体处理后的 LO2 细胞中低表达;红色:基因在经外泌体处理后的 LO2 细胞中高表达;黑色:该基因在二者中无明显差异。

图 3 正常 LO2 细胞经 HepG2 细胞外泌体处理后差异表达 circRNA 聚类分析热图

表 2 正常 LO2 细胞经 HepG2 细胞外泌体处理后表达上调和下调的 circRNA(倍数改变排列在前 10 的 circRNA)

circRNA	P	FC (abs)	上下调变化趋势	circRNA 来源染色体	circ RNA 序列正负链来源	circRNA_type	来源母基因名称
hsa_circRNA_001044	0.018 079 4	2.981 169 0	上调	chr12	-	sense overlapping	SLC2A13
hsa_circRNA_009012	0.009 314 2	2.831 351 8	上调	chr7	-	sense overlapping	STX1A
hsa_circRNA_101016	0.011 635 3	2.813 044 0	上调	chr12	-	exonic	DUSP16
hsa_circRNA_100917	0.036 493 0	2.798 301 3	上调	chr11	-	exonic	PICALM
hsa_circRNA_007918	0.017 564 9	2.763 415 7	上调	chr12	-	exonic	SLC2A13
hsa_circRNA_100913	0.037 210 3	2.750 609 2	上调	chr11	-	exonic	PICALM
hsa_circRNA_103855	0.010 042 8	2.750 348 6	上调	chr5	-	exonic	ADAMTS6
hsa_circRNA_006783	0.007 190 5	2.688 017 8	上调	chr14	+	intronic	SIP1L1
hsa_circRNA_002971	0.026 638 4	2.633 430 8	上调	chr6	+	exonic	SNX9
hsa_circRNA_101008	0.013 437 6	2.629 824 0	上调	chr12	+	exonic	RIMKLB
hsa_circRNA_002082	0.004 426 5	11.402 459 0	下调	chr11	+	Sense overlapping	MALAT1
hsa_circRNA_103128	0.001 343 2	5.648 528 7	下调	chr21	+	exonic	DYRK1A
hsa_circRNA_092388	0.001 068 0	5.343 677 9	下调	chr11	+	Sense overlapping	INCENP
hsa_circRNA_007343	0.003 906 8	5.221 220 8	下调	chr5	+	exonic	TRIO
hsa_circRNA_071935	0.007 441 5	5.045 021 8	下调	chr5	+	exonic	TRIO
hsa_circRNA_404643	0.007 997 8	4.985 613 3	下调	chr1	-	exonic	PIK3C2B
hsa_circRNA_101996	0.000 806 8	4.815 817 5	下调	chr17	+	exonic	SPECC1
hsa_circRNA_001691	0.021 440 2	4.457 308 6	下调	chr7	-	exonic	HNRNPA2B1
hsa_circRNA_101965	0.002 547 8	4.446 981 5	下调	chr17	-	exonic	DHX33
hsa_circRNA_004796	0.000 282 1	4.310 470 6	下调	chr17	+	exonic	KPNB1

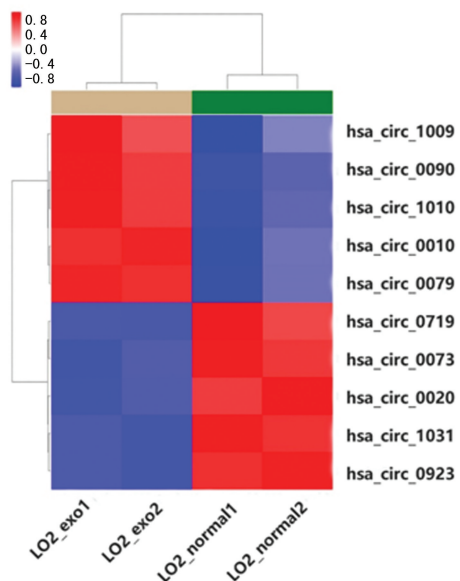


图 4 正常 LO2 细胞经 HepG2 细胞外泌体处理后差异表达上调和下调的 circRNA 聚类分析热图

## 2.6 差异表达 circRNA 的 GO、KEGG 分析结果

GO 富集分析经 HepG2 外泌体处理后 LO2 细胞中表达上调或下调前 5 个的 circRNA 宿主基因可能参与的生物过程主要富集在转录、转录调控, RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控, Rac 蛋白信号传导的调控, 血管内皮生长因子受体信号通路等; 可能参与的细胞成分主要富集在核仁、细胞质、核质、细胞膜等; 可能参与的分子功能主要富集在蛋白质结合、DNA 结合、转录因子激活结合、N-乙酰转移酶活性等。KEGG 信号通路分析发现经 HepG2 外泌体处理后 LO2 细胞中表达上调或下调前 5 个的 circRNA 的宿主基因与细胞周期、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路、神经营养蛋白信号通路、肿瘤发生等密切相关。

## 3 讨论

外泌体是一种具有双层脂膜结构的细胞外小泡, 由 JOHNSTONE 等<sup>[3]</sup>在 1989 年研究成熟的绵羊网织红细胞时发现报道。外泌体经细胞“内吞-融合-外排”等过程形成直径为 50~140 nm 圆形或椭圆形囊泡, 广泛分布于血浆、脑脊液、乳汁、胸腹腔积液、尿液等物质中, 甚至存在于细胞培养上清液中<sup>[4]</sup>, 其内含丰富的核酸[(微小 RNA(micro RNA, miRNA)、长非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、circRNA 等]、蛋白质、脂质等生物活性物质可在细胞间进行信号传递<sup>[5]</sup>。外泌体参与了细胞之间或细胞与组织之间重要信息和物质的交换, 在人类细胞生长、发育、分化、衰老等生理过程中发挥着重要作用。越来越多的研究表明, 外泌体参与了细胞间通讯和微环境调节, 可促进病毒扩散及炎症的发生, 诱导肿瘤细胞之间交换致癌因子并维持相邻基质细胞的肿瘤生长, 在肿瘤转移、发生中具有重要作用; 通过传递非编码 RNA 触发化学耐药性诱导肝脏疾病的恶性转化, 刺

激免疫激活及免疫逃逸, 可作为生物标志物用于肿瘤的预测和诊治<sup>[6-8]</sup>。

circRNA 是由 5' 和 3' 末端首尾环化形成一个特殊环状结构, 通过套索驱动环化和内含子配对驱动环化形成的 circRNA<sup>[9-10]</sup>, 其结构稳定在体内不易被核酸酶降解。近年来, 随着高通量测序技术和生物信息学的迅速发展, circRNA 广泛存在于不同生物的细胞质中, 具有多样性、高度稳定性、时空特异性等<sup>[11-12]</sup>。在胃癌、乳腺癌、结肠癌等恶性肿瘤中的研究发现, circRNA 可与 miRNA 结合, 竞争性抑制 miRNA 的转录调控, 进而影响肿瘤的生长、发育<sup>[13-15]</sup>。此外, 在多种恶性肿瘤中发现, 肿瘤分泌的外泌体中存在大量差异表达的 circRNA, 研究其影响肿瘤生长、发育的生物功能, 可作为一种生物标志物在肿瘤诊断、预后评估等方面具有极大的潜力<sup>[16]</sup>。

肝癌分泌的外泌体中含丰富的核酸(miRNA、lncRNA、circRNA 等), 在肝癌的发生、发展中起着重要的作用, 其生物功能也成为研究热点之一。肝癌细胞分泌的外泌体 miRNA-21 能使肝星状细胞向肿瘤相关的成纤维细胞转化促进肿瘤的发生<sup>[17]</sup>。肝癌高转移的肝癌细胞分泌的外泌体 miRNA-1247-3p 可直接作用靶向 B4GALT3 基因促使肝细胞癌(HCC)向肺癌转移<sup>[18]</sup>。转化生长因子  $\beta$  选择性使 lincRNA-ROR 在肝癌细胞分泌的外泌体中表达增加, 使 HCC 细胞对索拉非尼敏感性降低, 对其产生耐药性而降低疗效<sup>[19]</sup>。在肝癌 HepG2、97L、LM3 等细胞系分泌的外泌体中发现, circPTGR1 与间质表皮转化因子(MET)竞争性靶向 miRNA449a 促进肝癌的发生、发展<sup>[20]</sup>。肝癌细胞分泌的外泌体 circ-100338 可通过作用人脐静脉内皮细胞促进血管生成, 使肝癌发生转移<sup>[21]</sup>。Circ-0061395 在肝癌分泌的外泌体中表达增加, 可通过 miR-877-5p/PIK3R3 轴影响细胞增殖、侵袭、迁移等能力促进肝癌的发生、发展<sup>[22]</sup>。肝癌细胞分泌的外泌体中 circUHRF1 表达增加造成自然杀伤细胞功能紊乱, circUHRF1 可通过降解 miR-449c-5p 上调 TIM-3 的机制诱导自然杀伤细胞的功能障碍, 参与免疫抑制导致肝癌预后较差<sup>[23]</sup>。因此, 肝癌分泌的外泌体中含有大量核酸物质在肝癌转移、发生、发展及治疗中均发挥了重要的作用, 在肝癌的诊断和预后治疗方面具有巨大潜力, 外泌体中更多的核酸其生物功能需进一步研究发现。

本研究通过 HepG2 细胞外泌体与正常 LO2 细胞共同培养后对其 circRNA 表达谱进行了全面测序, 按  $FC > 2$  且  $P < 0.05$  为筛选标准, 筛选出 235 个差异表达的 circRNA, 其中 50 个 circRNA 上调表达, 185 个 circRNA 下调表达。通过火山图、聚类热图等分析, 在 HepG2 细胞外泌体与正常 LO2 细胞共同培养后筛选出差异表达明显上调或下调的前 5 个 circRNA, 并通过实时荧光定量 PCR 验证 hsa\_

circRNA\_0010044、hsa\_circRNA\_009012、hsa\_circRNA\_101016、hsa\_circRNA\_100917、hsa\_circRNA\_007918 等 circRNA 经外泌体处理后表达水平明显上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); hsa\_circRNA\_002082、hsa\_circRNA\_103128、hsa\_circRNA\_092388、hsa\_circRNA\_007343、hsa\_circRNA\_071935 等 circRNA 经外泌体处理后表达水平明显下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。通过 GO、KEGG 富集分析,经 HepG2 外泌体处理后 LO2 细胞中表达上调或下调前 5 个的 circRNA 的宿主基因可能参与了转录调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的调控血管内皮生长因子受体信号通路、蛋白质结合、DNA 结合、转录因子激活结合、细胞周期、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、神经营养蛋白信号通路等生物过程。细胞周期是细胞分裂和复制的过程,与细胞增殖、分化密切相关,而细胞增殖失控正是癌症发生、发展的特征之一<sup>[24]</sup>。

综上所述,hsa\_circRNA\_0010044、hsa\_circRNA\_009012、hsa\_circRNA\_101016、hsa\_circRNA\_100917、hsa\_circRNA\_007918 等 5 个表达上调和 hsa\_circRNA\_002082、hsa\_circRNA\_103128、hsa\_circRNA\_092388、hsa\_circRNA\_007343、hsa\_circRNA\_071935 等 5 个表达下调的 circRNA 可能影响肝癌的发生、发展,有可能成为潜在的生物标志物,为今后研究肝癌的发生机制提供了理论依据。同时,本研究尚存在一些不足,由于实验条件和时间的限制对差异表达的 circRNA 只在细胞上进行了初步的验证其表达,并未进行后续实验验证。因此,今后仍需增加后续相关验证实验,逐步验证其生物功能,进一步研究 circRNA 在肝癌发生、发展中的作用机制。

## 参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] SHI X, WANG B, FENG X, et al. circRNAs and exosomes: a mysterious frontier for human cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 384-392.
- [3] JOHNSTONE R M, BIANCHINI A, TENG K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions [J]. Blood, 1989, 74(5): 1844-1851.
- [4] QU Z, WU J, WU J, et al. Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 159.
- [5] KALLUNI R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1208-1215.
- [6] ABUDOUREYIMU M, ZHOU H, ZHI Y, et al. Recent progress in the emerging role of exosome in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12541.
- [7] LIU H, LI B. The functional role of exosome in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144(11): 2085-2095.
- [8] LI L M, LIU Z X, CHENG Q Y. Exosome plays an important role in the development of hepatocellular carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(8): 152468.
- [9] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. Rna, 2013, 19(2): 141-157.
- [10] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs [J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148.
- [11] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. Nature, 2013, 495(7441): 333-338.
- [12] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264.
- [13] ZHANG J, HOU L, LIANG R, et al. CircDLST promotes the tumorigenesis and metastasis of gastric cancer by sponging miR-502-5p and activating the NRAS/MEK1/ERK1/2 signaling [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 80.
- [14] YANG R, XING L, ZHENG X, et al. The circRNA circAGFG1 acts as a sponge of miR-195-5p to promote triple-negative breast cancer progression through regulating CCNE1 expression [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 4.
- [15] LI X, SHEN M. Circular RNA hsa\_circ\_103809 suppresses hepatocellular carcinoma proliferation and invasion by sponging miR-620 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 555-566.
- [16] MENG S, ZHOU H, FENG Z, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 94.

- [13] HATEM S N, RWDHEUIL A, GANDJBA-KHCH E. Cardiac adipose tissue and atrial fibrillation; the perils of adiposity [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109(4):502-509.
- [14] SHEN D F, TANG Q Z, YAN L, et al. Tetrandrine blocks cardiac hypertrophy by disrupting reactive oxygen species-dependent ERK1/2 signalling [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159(4):970-981.
- [15] GUO J, JIA F, JIANG Y, et al. Potential role of MG53 in the regulation of transforming-growth-factor-beta1-induced atrial fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(2):436-443.
- [16] KAWAGUCHI M, TAKAHASHI M, HATA T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6):594-604.
- [17] WANG Y, WU Y, CHEN J, et al. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation [J]. *Cardiology*, 2013, 126(1):1-11.
- [18] HE G, TAN W, WANG B, et al. Increased M1 macrophages infiltration is associated with thrombogenesis in rheumatic mitral stenosis patients with atrial fibrillation [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0149910.
- [19] 阎雯, 齐薛浩. 白藜芦醇对新生大鼠神经元缺血缺氧时 SDF-1/CXCR4 通路抗凋亡作用的调控机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7):1177-1182.
- [20] ZHU X D, LEI X P, DONG W B. Resveratrol as a potential therapeutic drug for respiratory system diseases [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11:3591-3598.
- [21] SAWDA C, MOUSSA C, TURNER R S. Resveratrol for Alzheimer's disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403(1):142-149.
- [22] BREUSS J M, ATANASOV A G, UHRIN P. Resveratrol and its effects on the vascular system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1523.

(收稿日期:2021-02-18 修回日期:2021-05-08)

(上接第 3611 页)

- [17] ZHOU Y, REN H, DAI B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):324.
- [18] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):191.
- [19] TAKAHASHI K, YAN IK, KOGURE T, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer [J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4:458-467.
- [20] WANG G, LIU W, ZOU Y, et al. Three isoforms of exosomal circPTGR1 promote hepatocellular carcinoma metastasis via the miR449a-MET pathway [J]. *EBio Med*, 2019, 40:432-445.
- [21] HUANG X Y, HUANG Z L, HUANG J, et al. Exosomal circRNA-100338 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via enhancing invasiveness and angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):20.
- [22] YU Y, BIAN L, LIU R, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0061395 accelerates hepatocellular carcinoma progression via regulation of the miR-877-5p/PIK3R3 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):10.
- [23] ZHANG P F, GAO C, HUANG X Y, et al. Cancer cell-derived exosomal circUHRF1 induces natural killer cell exhaustion and may cause resistance to anti-PD1 therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):110.
- [24] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.

(收稿日期:2021-02-11 修回日期:2021-05-08)