

·生物信息学·

转录组测序筛选口腔鳞状细胞癌中差异表达环状 RNA

翟 堃^{1,2}, 刘絮影², 李锦存², 胡 晨^{1,2}, 于丽丽^{1,2}, 樊美荣³, 黄永清^{1,2}, 马 坚^{1,2}

(1.宁夏医科大学总医院口腔颌面外科, 宁夏 银川 750003;

2.宁夏医科大学口腔医学院, 宁夏 银川 750004;

3.深圳南油麦芽口腔门诊部, 广东 深圳 518054)

摘要:目的 利用转录组测序技术对口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织进行测序, 筛选 OSCC 中差异表达的环状 RNA(circRNA), 并探讨可能与 OSCC 相关的信号通路。方法 收集 3 对 OSCC 患者的癌及癌旁正常组织, 提取总 RNA, 构建 circRNA 文库, 对其进行转录组测序, 获得 circRNA 表达谱, 筛选差异表达 circRNA 并进行 GO 和 KEGG 分析; 构建 ceRNA 网络, 分析预测 circRNA 在 OSCC 中的作用, 并利用 cytoscape 软件对网络进行可视化。结果 本研究鉴定出了差异表达的 circRNA 281 个, 上调的有 33 个, 下调的有 248 个。GO 富集分析中主要参与细胞器组织的调节、GTP 酶活性的调节; 细胞组分主要在锚定连接、P 小体; 分子功能在核苷三磷酸酶调节活性、GTPase 激活剂活性等生物学过程; KEGG 主要富集在肌动蛋白细胞骨架的调节、调节干细胞多能性的信号通路、ErbB 信号通路、细胞粘附连接等通路。最终筛选出 7 个差异表达的 circRNA、2 个差异表达的 miRNA 和 3 个差异表达的 mRNA。结论 通过转录组测序鉴定出口腔鳞状细胞癌 circRNA 几乎全部为的外显子 circRNA, 主要富集在肌动蛋白细胞骨架的调节、GTP 酶活性的调节等通路。

关键词: 口腔鳞状细胞癌; 环状 RNA; 转录组测序

中图分类号: R739.8

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.12.001

文章编号: 1006-1959(2024)12-0001-06

Transcriptome Sequencing in Screening Differentially Expressed Circular RNAs in Oral Squamous Cell Carcinoma

ZHAI Kun^{1,2}, LIU Xu-ying², LI Jin-cun², HU Chen^{1,2}, YU Li-li^{1,2}, FAN Mei-rong³, HUANG Yong-qing^{1,2}, MA Jian^{1,2}

(1.Department of Oral and Maxillofacial Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, Ningxia, China;

2.School of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China;

3.Maiya Dental Clinic of Nanyou, Shenzhen 518054, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To screen the differentially expressed circular RNA (circRNA) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) by transcriptome sequencing, and to explore the possible signaling pathways related to OSCC. **Methods** Three pairs of cancer and paracancerous normal tissues of OSCC patients were collected. CircRNA library was constructed after extracting total RNA, then transcriptomic sequencing was carried out. The profile of circRNA was identified and annotated to obtain differentially expressed circRNAs, which were analyzed by GO and KEGG. Meanwhile, the ceRNA network was constructed to analyze and predict the role of circRNA in OSCC, and the network was visualized by cytoscape software. **Results** In this study, 281 differentially expressed circRNAs were identified, of which 33 were up-regulated and 248 were down-regulated. GO enrichment analysis was mainly involved in the regulation of organelle tissue and GTPase activity. The cell components were mainly anchored junctions and P bodies. Molecular function in nucleoside triphosphatase regulatory activity, GTPase activator activity and other biological processes; KEGG was mainly enriched in the regulation of actin cytoskeleton, signaling pathways regulating stem cell pluripotency, ErbB signaling pathway, cell adhesion and connection. Finally, 7 differentially expressed circRNAs, 2 differentially expressed miRNAs and 3 differentially expressed mRNAs were screened. **Conclusion** Transcriptome sequencing identified that almost all of the oral squamous cell carcinoma circRNA are exon circRNA, which are mainly enriched in the regulation of actin cytoskeleton and the regulation of GTPase activity.

Key words: Oral squamous cell carcinoma; Circular RNA; Transcriptome sequencing

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinomas, OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤^[1]。全球唇癌、口腔癌和咽喉癌的发病人数约为 52.95 万例,死

亡人数约为 29.23 万人, 分别占有所有癌症病例的 3.8%和癌症死亡人数的 3.6%^[2]。OSCC 早期症状与良性病变不易区分,发现时已进入中晚期,其平均

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(编号: 2021AAC03377、2021AAC03357、2022AAC03473)

作者简介: 翟堃(1984.12-),男,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事口腔临床、唇腭裂和口腔肿瘤基础研究

通讯作者: 马坚(1981.3-),男,宁夏同心人,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事口腔临床、唇腭裂和口腔肿瘤基础研究

5年生存率为 50%^[3]。因此,寻找与疾病发生和发展相关的肿瘤标志物,实现早诊、早治及预后判断至关重要。CircRNA 是一种特殊的内源性非编码 RNA,1976 首次在仙台病毒中被发现,随后在真核生物中也出现相关报道^[4,5]。近年来,已经在不同的细胞系和物种中发现了大量 circRNA。作为一类非编码 RNA 家族的成员,其在真核生物转录组中广泛表达,其与线性 RNA 的不同之处在于其 3'端与 5'端相连,形成闭合的共价环状结构。该结构使 circRNA 耐酶消化,较线性 RNA 更加保守和稳定^[6]。目前, circRNA 被认为与 mRNA 相似,是 mRNA 前体修饰的重要产物^[7]。同时, circRNA 可作为竞争性的内源性 RNA(ceRNAs),多个 circRNA 具有 miRNA 反应元件(MREs),使其能够与 miRNA 相互作用,并阻止 miRNA 与靶 mRNA 的相互作用,进而来调控靶基因表达^[8-10]。越来越多的研究发现^[11,12], circRNA 的异常表达可引起正常组织中基因表达紊乱,从而导致克隆增殖异常和病理病变,是多种致癌因素共同作用的结果。大量研究表明^[13,14], circRNA 已被证实参与了多种疾病的发生发展,包括乳腺癌、泌尿系统癌。另外, Li L 等^[15]研究表明, Circ_LPAR3 在 OSCC 中表达上调,并通过 miR-513b-5p 激活 VEGFC 和 AKT1 来促进了 OSCC 的进展。最近的研究发现,部分 circRNA 具有较为明显的抑癌效应^[16]和促癌作用^[17]。CircRNA 在 OSCC 细胞系和组织中显著的差异表达,可作为恶性肿瘤的新型分子标志物。所有这些特征使得 circRNA 具有潜在分子诊断标志物价值,但其表达特性在 OSCC 中报道较少。本研究应用 3 对口腔鳞状细胞癌患者组织进行转录组测序,筛选出与 OSCC 发生发展相关的差异表达 circRNA 并探索其相关通路,构建相关的竞争性内源 RNA 网络,期望寻找出 OSCC 的相关生物标记物。

1 材料与方法

1.1 研究对象 研究对象来源于 2019 年 2 月-10 月宁夏医科大学总医院口腔颌面外科病房住院行 OSCC 手术患者 3 例,样本采集均征得患者同意,且签署知情同意书。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会审批通过后开展。研究对象疾病诊断均由专科医师及病理诊断明确后纳入。纳入标准:①病理学诊断为 OSCC(舌/颊/牙龈部位)的癌及癌旁正常组织;②患者术前均未接受过放化疗;③原发性肿瘤;④首次行 OSCC 病损切除术;⑤无其他肿瘤及相

关系统性病史。排除标准:①继发性肿瘤;②术前接受过放化疗;③有其他肿瘤及相关系统性病史。

1.2 提取总 RNA 使用 Trizol Reagent 提取组织样本中的总 RNA,其质量要求通过 Agilent 2100 BioAnalyzer 检测结果 $RIN \geq 7$, 28S 和 18S 的 RNA 的比值 $\geq 1.5:1$,起始量的要求范围是 2~3 μg 。

1.3 文库构建及测序构建 circRNA 的链特异性文库,去除总 RNA 中的 rRNA 并进行 RNA 片段化处理,然后进行第一链和第二链 cDNA 合成,继而修复 cDNA 尾端、加 dA 尾、连接接头,再进行 PCR 扩增,质检合格后混合文库并测序。

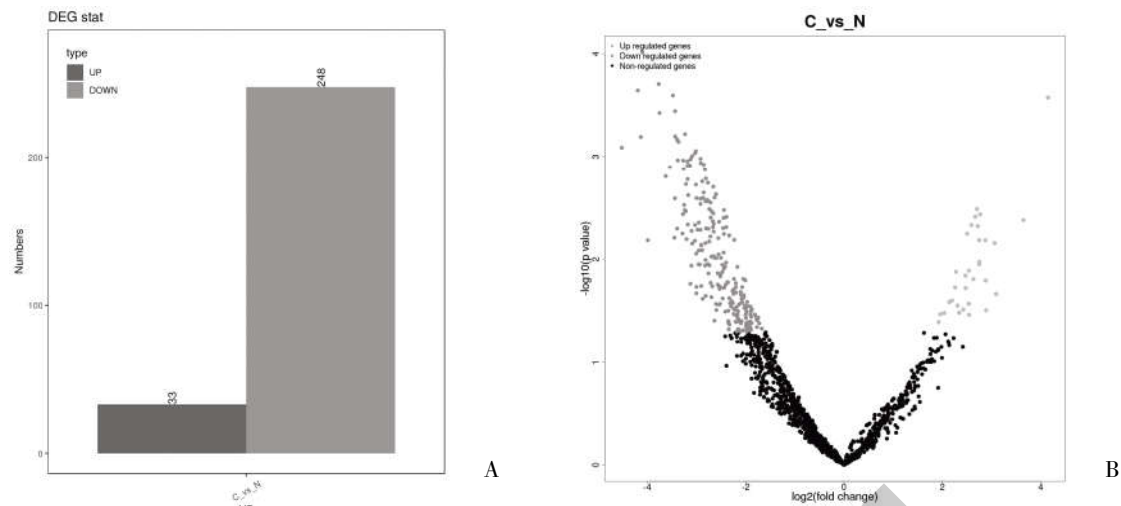
1.4 CircRNA 差异表达分析 使用 limma 软件根据 circRNA 的 ID,提取表达量结果进行统计分析,得到 circRNA 的差异分析结果。差异 circRNA 筛选标准为: $|\log_2FC| > 1$ 且 P 值 ≤ 0.05 ,其中实验或对照组中至少一组表达量平均值 ≥ 0.5 ,表达的样本数占总的样本数的 2/3 或实验组或对照组中至少一组中有 2/3 以上的样本表达此基因,且要求该组的平均表达量 ≥ 1 。

1.5 CeRNA 网络构建 为了进一步研究 circRNA 在 OSCC 中的可能机制,首先基于差异 circRNA-mRNA 和 circRNA-miRNA 的共表达分析。共表达分析的基本方法是对差异 circRNA、mRNA 和 miRNA 的全部样本表达值进行相关性计算,筛选出显著相关的 circRNA-miRNA-mRNA 的 ceRNA 网络。

1.6 GO 和 KEGG 功能注释富集分析 利用 KOBAS 数据库将得到的 ceRNA 网络中 circRNA 进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 分析,进一步了解 circRNA 可能参与的生物学功能。

2 结果

2.1 CircRNA 在 OSCC 中的表达谱 通过转录组测序技术共鉴定出 5156 个 circRNA,其中 4655 个已知,501 个未报道。统计分析显示 281 个显著差异表达 circRNA 中,上调的有 33 个(11.74%),下调的有 248 个(88.26%),见图 1A、1B。其中,上调和下调的差异表达最为明显的前 5 个 circRNA,见表 1。OSCC 组织标本中 circRNA 表达水平有明显的差异,并呈聚类关系见图 2。此外,还发现外显子 circRNA 数量几乎占差异表达 CircRNA 的 100%,见图 3A、3B。

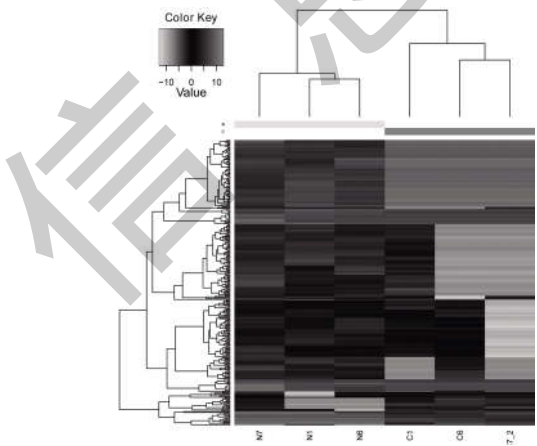


注:A:差异表达 circRNA 数目统计图;B:差异表达 circRNA 火山图。

图 1 差异表达 circRNA 数目统计图及火山图

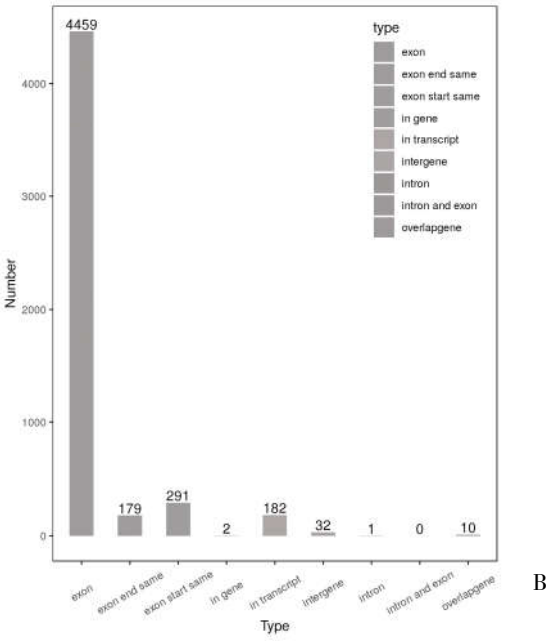
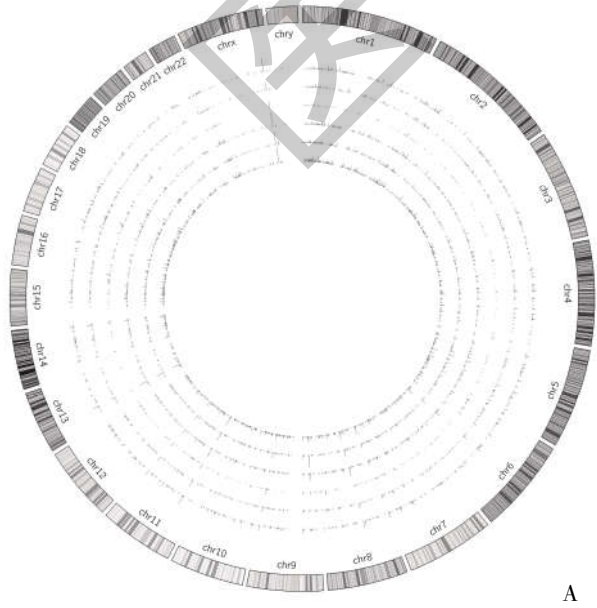
表 1 前 5 上调和下调差异表达 CircRNA

number	logFC	P value	regulation
CBT15_circR_2060	2.89	0.03	up
CBT15_circR_1140	3.06	0.01	up
CBT15_circR_3681	3.09	0.02	up
CBT15_circR_3272	3.65	0.00	up
CBT15_circR_4604	4.15	0.00	up
CBT15_circR_4931	-3.99	0.01	down
CBT15_circR_860	-4.10	0.00	down
CBT15_circR_4037	-4.14	0.00	down
CBT15_circR_4211	-4.20	0.00	down
CBT15_circR_4057	-4.52	0.00	down



注:C1 和 N1,C6 和 N6,C7_2 和 N7 共 3 对癌组织和癌旁正常组织。

图 2 差异 circRNA 聚类分析图



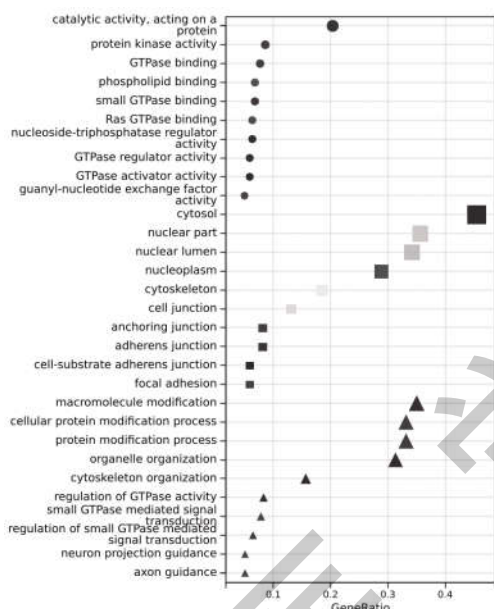
注:A:CircRNA circos 图;B:CircRNA 组成结构类型图。

图 3 CircRNA circos 图

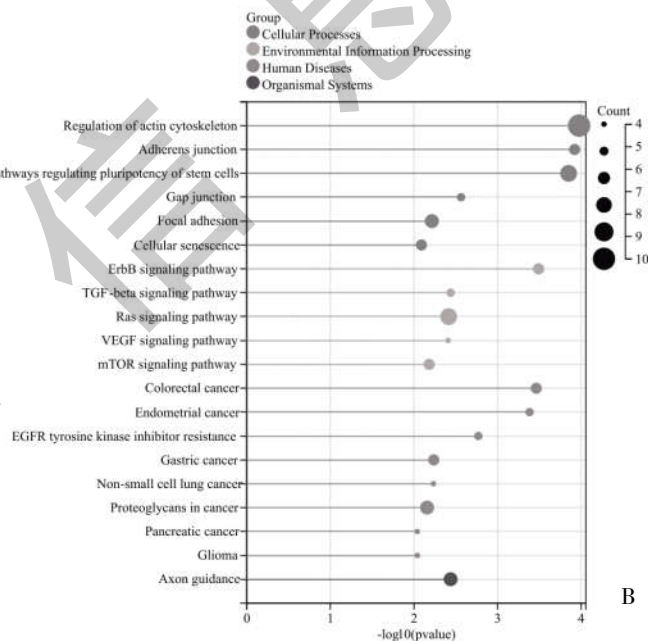
2.2 差异表达 circRNA 富集分析 GO 富集分析包括分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component)、生物过程 (biological process) 3 部分。其中在分子功能部分中差异表达 circRNA 主要富集在 GTP 酶激活剂活性、核苷-三磷酸酶调节活性、GTP 酶调节活性催化活性, 小 GTP 酶结合、GTP 酶结合等; 在细胞组分中主要参与了细胞质、粘着连接、细胞核、细胞连接等; 生物学过程含有细胞骨架组织、GTP 酶活性的调节、细胞器组织、大分子修饰、调节小 GTP 酶介导的信号转导等生物学过程, 见图 4A。KEGG 富集分析结果显示: 差异表达 circRNA 主要参与了, 肌动蛋白细胞骨架的调节、细胞连接, 调节干细胞多能性调节信号通路, 缝隙连接、TGF- β 信

号等通路, 见图 4B。

2.3 CeRNA 网络构建 基于测序结果分析的 circRNA-miRNA 相互作用、miRNA-mRNA 相互作用的预测, 最终筛选出 7 个差异表达的 circRNA、2 个差异表达的 miRNA 和 3 个差异表达的 mRNA 构建 circRNA-microRNA-mRNA 网络, 见图 5。7 个差异表达的 circRNA 和 2 个 miRNA 形成 8 对相互作用, 2 个差异表达的 miRNA 和 3 个差异表达的 mRNA 形成 3 对相互作用, 7 个差异表达的 circRNA 和 3 个差异表达的 mRNA 形成 12 对相互作用, 最终构成包含 12 个节点和 23 条线的 circRNA-microRNA-mRNA 调控网络。



A



B

注:A:GO 富集分析图;B:KEGG 富集分析图。

图 4 差异表达 circRNA 富集分析图

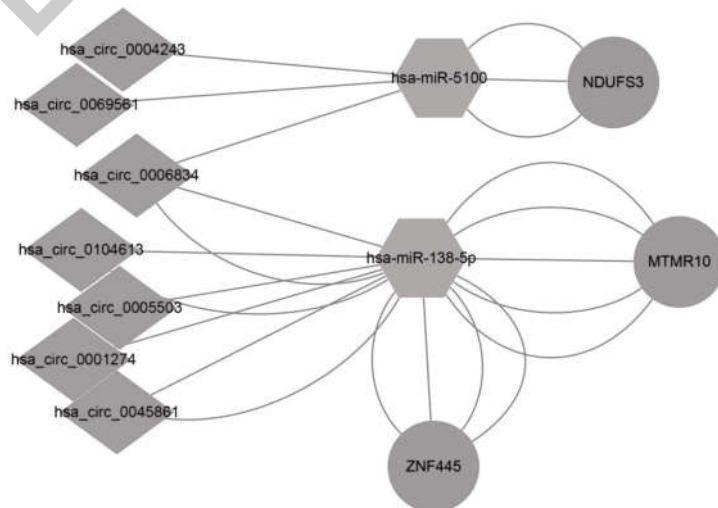


图 5 CeRNA 相互作用网络图

3 讨论

口腔癌是一种常见的头颈恶性肿瘤, 占有恶性肿瘤的 2%~4%, 其中 90% 以上的口腔癌为 OSCC^[18]。其发病原因仍不清楚, 寻找肿瘤的生物标志物成为提高该类疾病治疗水平及预后的一个研究热点。随着生物信息学的发展, 研究显示 circRNA 与 OSCC 的发生发展有相关性。在 OSCC 研究中已经发现异常表达 circRNA 有作为潜在生物标志物的可能, 比如 Li B 等^[19]通过高通量测序及逆转录-定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 验证了 hsa_circ_0008309 口腔鳞状细胞癌组织中表达明显下调且与病理分化有显著相关性。

本研究通过转录组测序获得 3 对 OSCC 癌及癌旁正常组织标本中 circRNA 的表达谱。共鉴定出 5156 个 circRNA; 其中大部分 circRNA 存在于 circRNA 数据库为已知 ($n=4655, 96.44\%$), 少部分为未报道的 circRNA ($n=501, 3.56\%$)。281 个差异表达 circRNA 中, 上调的有 33 个 (11.74%), 下调的有 248 个 (88.26%)。此外, 还发现外显子 circRNA 数量几乎占差异表达 circRNA 的 100%; 但既往研究报道与 OSCC 相关的 circRNA, 本次转录组测序结果中并未筛查出。火山图和分层聚类热图显示, 与相邻组织标本相比, OSCC 组织标本中 circRNA 表达水平有明显的差异, 并呈聚类关系。

GO 富集分析不管在分子功能部分中还是生物学过程中差异表达 circRNA 都参与了 GTP 酶的相关的信号通路。有研究表明^[20], GTP 酶与肿瘤的发生发展息息相关。在 KEGG 和 GO 分析的细胞组部分结果显示, 差异表达 circRNA 都参与了细胞连接等信号通路。细胞连接在肿瘤的扩散能力中可能具有重要作用。有研究表明^[21], 部分基因的表达可以破坏细胞-细胞连接结构, 从而影响细胞的侵袭能力。KEGG 富集分析显示, 差异表达 circRNA 与 TGF- β 信号通路及调节干细胞多性能信号通路等也有显著相关性。其中 TGF- β 信号通路也是 circRNA 对 OSCC 作用最显著的信号通路。Zhang X 等^[22]研究表明, circLDLRAD3 在 OSCC 中下调, 并通过海绵 miR-558 调控 TGF- β 信号通路, 抑 OSCC 的发展并影响 EMT 过程。TGF- β 信号转导异常还有可能导致多种疾病的发生, 比如胚胎发育异常、肿瘤、组织纤维化、心血管疾病和免疫性疾病等。调节干细胞多功能性的信号通路也是 circRNA 对 OSCC 作用最显

著的信号通路之一。

研究共构建出 41 个 ceRNA 网络, 其中上调的有 7 个, 下调有 34 个。有的 circRNA 可与多个 microRNA 相结合, 与每个 microRNA 也可有多个结合位点; 有的 circRNA 只可与一个 microRNA 相结合, 且与 microRNA 结合位点较少, 只有数个; 其中 CBT15_circR_3482 可与 79 个 microRNA 进行结合, 数量为最多; hsa-miR-1273h-5p 与 CBT15_circR_3482 结合位点数目为 85 个, hsa-miR-6780a-5p 与 CBT15_circR_3482 结合位点数目为 70 个, hsa-miR-3192-5p 与 CBT15_circR_3482 结合位点数目为 69 个, 远高于其他 microRNA 与 circRNA 的结合位点数目。在 ceRNA 网络中, CBT15_circR_3482 的表达量为上调, CBT15_circR_2486、CBT15_circR_2485、CBT15_circR_227、CBT15_circR_4852、CBT15_circR_1731 的表达量均为下调。CBT15_circR_3482 的表达量上调, 且可与 79 个 microRNA 进行结合, 结合位点数目远高于其他 circRNA 与这些 microRNA 的结合位点数目, 可推测出 CBT15_circR_3482 可能作为竞争性的内源性 RNA (ceRNAs), 通过与 microRNA (hsa-miR-1273h-5p、hsa-miR-6780a-5p、hsa-miR-3192-5p 等) 相结合, 作为 microRNA 海绵来隔离 microRNA, 并阻止 microRNA 与靶 mRNA 的相互作用, 来调控靶基因表达。CircRNA-microRNA 网络显示每个差异表达 circRNA 与多个肿瘤相关 microRNA 相关, 证实 circRNA 通过 microRNA 海绵效应促进肿瘤的发展。到目前为止, 关于 circRNA 在 OSCC 中的作用的研究报道依旧较少, 筛选 OSCC 中潜在的 circRNA 标志物并探究其潜在的机制尤为重要。circRNA 的主要功能是通过 miRNA 反应元件 (MRE) 结合并吸收 rna 结合蛋白。与此同时, 许多研究也发现一些 circRNA 可以被翻译^[23,24]。CircRNAs 在 OSCC 中起 microRNA 海绵的作用, 其潜在的生物学功能有待进一步研究验证。本次研究通过全转录组测序, 获得 circRNA 及 microRNA 表达谱, 进行了相关通路分析及 ceRNA 网络预测, 但是后续仍需要通过实验验证。

本研究通过转录组测序技术获得 3 对 OSCC 癌及癌旁正常组织标本中 circRNA 的表达谱。筛选出差异表达 circRNA 共 281 个, 并探索了其相关的信号通路, 其可能通过 GTP 酶的相关的信号通路、

TGF- β 信号通路及细胞连接等通路影响 OCC 的发生发展。同时,构建出 41 个 ceRNA 网络,其中上调的 circRNA 有 7 个,下调 circRNA 有 34 个。

参考文献:

- [1]Bugshan A,Farooq I.Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis[J].F1000Res,2020,9:229.
- [2]Gou QL,Zheng LL,Huang HX.Unravelling the roles of Autophagy in OSCC: A renewed perspective from mechanisms to potential applications[J].Front Pharmacol,2022,13:994643.
- [3]He SQ,Zhang W,Li X,et al.Oral squamous cell carcinoma (OSCC) -derived exosomal MiR -221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation[J].Bioengineered,2021,12(1):2164-2174.
- [4]Kristoffersen EL,Burman M,Noy A,et al.Rolling circle RNA synthesis catalyzed by RNA[J].Elife,2022,11:e75186.
- [5]Chien Y,Tsai PH,Lai YH,et al.CircularRNA as novel biomarkers in liver diseases[J].J Chin Med Assoc,2020,83(1):15-17.
- [6]Hsu MT,Coca-Prados M.Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells[J].Nature,1979,280(5720):339-340.
- [7]Jensen PSH,Johansen M,Bak LK,et al.Yield and Integrity of RNA from Brain Samples are Largely Unaffected by Pre-analytical Procedures[J].Neurochem Res,2021,46(3):447-454.
- [8]Li BW,Wang F,Li X,et al.Hsa_circ_0008309 May Be a Potential Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma [J].Dis Markers,2018,2018:7496890.
- [9]Kristensen LS,Andersen MS,Stagsted LVW,et al.The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J].Nat Rev Genet,2019,20(11):675-691.
- [10]Memczak S,Marvin J,Antigoni E,et al.Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J].Nature,2013,495(7441):333-338.
- [11]Li J,Sun D,Pu WC,et al.Circular RNAs in Cancer: Biogenesis, Function, and Clinical Significance[J].Trends Cancer,2020,6(4):319-336.
- [12]Lei M,Zhang G,Ning Q,et al.Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J].Mol Cancer,2020,19(1):30.
- [13]Fu B,Liu W,Zhu C,et al.Circular RNA circBCBM1 promotes breast cancer brain metastasis by modulating miR-125a/BRD4 axis[J].Int J Biol Sci,2021,17(12):3104-3117.
- [14]Zhang ZH,Wang Y,Zhang Y,et al.The function and mechanisms of action of circular RNAs in Urologic Cancer [J].Mol Cancer,2023,22(1):61.
- [15]Li L,Yin Y,Nan F,et al.Circ_LPAR3 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) [J].Biochem Biophys Res Commun,2022,589:215-222.
- [16]Peng QS,Cheng YN,Zhang WB,et al.circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway [J].Cell Death Dis,2020,11(2):112.
- [17]Liu J,Jiang X,Zou A,et al.circIGHG -Induced Epithelial -to -Mesenchymal Transition Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression via miR -142 -5p/IGF2BP3 Signaling [J].Cancer Res,2021,81(2):344-355.
- [18]Feng RM,Zong YN,Cao SM,et al.Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J].Cancer Commun (Lond),2019,39(1):22.
- [19]Li B,Wang F,Li XS,et al.Hsa_circ_0008309 May Be a Potential Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma [J].Dis Markers,2018,2018:7496890.
- [20]Svensmark JH,Brakebusch C.Rho GTPases in cancer: friend or foe?[J].Oncogene,2019,38(50):7447-7456.
- [21]Rusu AD,Cornhill ZE,Coutiño BC,et al.CG7379 and ING1 suppress cancer cell invasion by maintaining cell-cell junction integrity[J].Open Biol,2021,11(9):210077.
- [22]Zhang X,Guo GY,Liu RY,et al.CircLDLRAD3 inhibits Oral squamous cell carcinoma progression by regulating miR -558/Smad4/TGF- β [J].J Cell Mol Med,2023,27(21):3271-3285.
- [23]Li X,Yang L,Chen LL.The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs[J].Mol Cell,2018,71(3):428-442.
- [24]Hansen TB,Hansen TB,Jensen TI,et al.Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J].Nature,2013,495(7441):384-388.

收稿日期:2023-09-02;修回日期:2023-09-20

编辑/肖婷婷