·论 著·

Circ_0007142吸附miR-647调控*CCR8*基因促进胃癌细胞的上皮-间质转化和侵袭

张学成[1]，关晓辉[2]

1. 吉林市中心医院消化科，吉林 吉林 132000；
2. 北华大学附属医院消化内科，吉林 吉林 132000

［**摘要**］ **背景与目的：**胃癌是常见的消化道恶性肿瘤，circ_0007142被证实为结直肠癌的致癌因子，能促进结直肠癌的进展。探究circ_0007142吸附miR-647调控*CCR*8基因对胃癌细胞上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）和侵袭的影响。**方法：**采用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）对组织和细胞中circ_0007142、miR-647、CCR8的表达进行检测；采用荧光原位杂交（fluorescence *in situ* hybridization，FISH）实验鉴定circ_0007142的亚细胞定位；采用双荧光素酶报告基因实验和RNA免疫沉淀（RNA immunoprecipitation，RIP）实验验证circ_0007142和miR-647、miR-647和CCR8的相互关系；采用transwell、克隆形成实验和蛋白质印迹法（Western blot）检测细胞的侵袭能力、集落形成能力和EMT程度；BALB/c裸小鼠移植瘤实验检测circ_0007142在体内的促瘤作用。**结果：**Circ_0007142和CCR8在胃癌组织和细胞中过表达，miR-647在胃癌组织和细胞中低表达。circ_0007142发挥分子海绵的作用抑制miR-647的表达，而miR-647通过与CCR8 mRNA的3'-UTR结合抑制CCR8表达。敲减circ_0007142或者上调miR-647的表达都可以抑制胃癌细胞的侵袭、克隆形成与EMT。而敲减circ_0007142或上调miR-647表达对胃癌细胞的影响能够被miR-647 inhibitor 或CCR8过表达部分逆转（*P*均<0.05）。此外，在胃癌细胞中敲减circ_0007142的表达能够抑制肿瘤的体内生长。**结论：**Circ_0007142吸附miR-647上调CCR8的表达，进而促进胃癌细胞的EMT和侵袭，促进胃癌的进展。

［**关键词**］Circ_0007142；miR-647；CCR8；胃癌；上皮-间质转化；侵袭

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.08.004

中图分类号：R735.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-3639(2021)08-0714-11

Circ_0007142 accelerates epithelial-mesenchymal transition and invasion of gastric cancer cells through sponging miR-647 and regulating *CCR*8 gene

ZHANG Xuecheng[1], GUAN Xiaohui[2] (1. Department of Gastroenterology, Beihua University, Jilin Central Hospital, Jilin 132000, Jilin Province, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132000, Jilin Province, China)

Correspondence to: GUAN Xiaohui E-mail: 87173680@qq.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** Gastric cancer is the most common malignant tumor of digestive tract. Circ_0007142 has been proved to be a carcinogenic factor of colorectal cancer and can promote the progression of colorectal cancer. This study aimed to explore the effects of circ_0007142 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of gastric cancer cells via absorbing miR-647 and then regulating *CCR*8 gene. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the expressions of circ_0007142, miR-647 and CCR8 in gastric cancer tissues and cells. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiment was adopted to determine the subcellular localization of circ_0007142. Dual luciferase reporter experiment and RNA immunoprecipitation (RIP) assay were used to confirm the targeting relationship of circ_0007142 and miR-647 as well as miR-647 and CCR8. Transwell assay, clone formation assay and Western blot were used to test the cell invasion ability, clonality and EMT respectively. Tumor xenograft in BALB/c nude mice was performed to detect tumorigenicity of circ_0007142 *in vivo*. **Results:** Overexpressions of circ_0007142 and CCR8 and downregulation of miR-647 were detected in gastric cancer tissues and cells. Circ_0007142 acted as a molecular sponge to inhibit the expression of miR-647, at the same time, miR-647 inhibited the

基金项目：吉林省卫生厅科技计划项目（2013S004）。

通信作者：关晓辉 E-mail：87173680@qq.com

expression of CCR8 by binding with the 3'-UTR of CCR8 mRNA. Knockdown of circ_0007142 or overexpression of miR-647 inhibited the invasion, colony formation and EMT of gastric cancer cells. However, the effects of circ_0007142 inhibition or miR-647 overexpression on gastric cancer cells were partially reversed by miR-647 inhibitor or CCR8 overexpression (all P<0.05). Moreover, knockdown of circ_0007142 in gastric cancer cells inhibited the tumor growth *in vivo*. **Conclusion:** Circ_0007142 upregulates the expression of CCR8 via sponging miR-647, which subsequently accelerates the EMT and invasion of gastric cancer cells and promotes the progression of gastric cancer.

［**Key words**］ Circ_0007142; miR-647; CCR8; Gastric cancer; Epithelial-mesenchymal transition; Invasion

胃癌发病率和死亡率高，是具有高度侵袭性和转移性的恶性肿瘤之一[1]。手术治疗、化疗、靶向治疗是目前治疗胃癌的有效方法[2]。胃癌具有高转移和侵袭的特征，因此晚期患者的治疗效果不佳[3]。所以，加深对胃癌的认识，在分子水平上探讨发病机制，寻找新的治疗靶点显得尤为重要。

环状RNA（circRNA）因其不易被核酸外切酶降解的特性而备受关注，能在体内保持稳定，具有作为疾病诊断标志物的巨大潜力[4]。近年来，研究[5]发现circRNA可以作为癌症的启动因子，例如circ-UMAD1在甲状腺癌患者的血清中表达相对较高，具有较高的生物标志物潜能。Circ_0003829在口腔鳞癌中表达降低，受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析circ_0003829在口腔鳞癌中具有较高的敏感性，可以作为口腔鳞癌诊断的生物标志物[6]。同样，circRNA也可以作为胃癌的启动因子，例如circ_0005556、circ-RNF111都可以促进胃癌的发展[7-8]。Circ_0007142作为最新发现的circRNA，被鉴定为结直肠癌的致癌基因，能促进结直肠癌的进展[9]，但在胃癌中的作用目前还没有被揭示。

经研究[10]发现，circRNA可以作为竞争性内源RNA，海绵化microRNA，进而调节下游靶基因，参与疾病的发展。在食管癌中circ_0008717通过调控miR-203/Slug来促进癌细胞的增殖、侵袭和迁移[11]。microRNA是一类短链RNA，属于非编码RNA的一个亚类，经常被视为抑癌基因并结合上游circRNA来进行研究，Xu等[12]在关于结直肠癌的研究中发现circRNA DSCAM-AS1通过miR-137/Notch1促进癌症发展，miR-137可以逆转DSCAM-AS1对结直肠癌的促进作用。Ma等[13]认为血清中miR-647的降低与胃癌患者的不良预后相关。但circ_0007142结合miR-647在胃癌中的作用尚未被证实，另外有研究[14]发现，miR-647的下游存在靶基因CC族趋化因子受体8（CC chemokine receptor 8，CCR8），抗CCR8治疗可以有效地抑制小鼠结肠癌肿瘤的生长。此外也有研究[15]表明胃淋巴瘤中CCR8表达上调。

根据以上发现，本研究探讨circ_0007142吸附miR-647调控CCR8在胃癌发展过程中的生物学作用，旨在为胃癌的靶向治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系与材料

GES-1细胞、AGS细胞、SNU-16细胞、GES-1细胞专用培养基、AGS细胞专用培养基均购自宁波明舟生物科技有限公司。TRIzol分离试剂、高容量cDNA反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）试剂盒、7500 Fast RTFQ-PCR系统、Lipofectamine™3000试剂、PVDF膜均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。荧光原位杂交（fluorescence *in situ* hybridization，FISH）实验试剂盒购自上海歌凡生物科技有限公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。pmirGLO双萤光素酶报告基因载体质粒、HEK-293T细胞均购自BioVector中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心。RIP试剂盒购自广州吉赛生物科技股份有限公司。Matrigel基质胶购自上海前尘生物科技有限公司。Transwell小室购自美国Corning公司。荧光显微镜购自徕卡显微系统（上海）有限公司。0.1%结晶紫染色、0.5%结晶紫染色、RIPA裂解液均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 临床组织与实验动物

从北华大学附属医院获取2018年3月—2020年4月就诊的胃癌患者的癌组织与邻近癌旁正常组织48组（距离原发灶边缘4.0~6.5 cm），其中男性患者25例，女性患者23例，TNM分期为：Ⅰ~Ⅱ期患者28例，Ⅲ期患者20例。参与该研究的所有患者承诺之前从未接受过任何放疗及化疗，并签署知情同意书。本实验严格遵守北华大学附属医院伦理委员会的要求。获取的组织存放于液氮中进行保存。20只SPF级BALB/c无菌裸小鼠，5周龄，质量为（19 ± 2）g，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。

1.3 细胞培养和转染

本研究使用人正常胃黏膜细胞GES-1和人胃癌细胞系AGS、SNU-16进行实验，GES-1细胞使用RPMI-1640培养基+10%胎牛血清+1%青霉素链霉素混合液进行培养，AGS、SNU-16细胞使用F-12培养基+10%胎牛血清+1%青霉素及链霉素混合液进行培养。所有细胞在37 ℃、CO_2体积分数为5%的环境中培养，1 d后更换新鲜培养基，继续进行培养。

当细胞培养到70%左右融合度，按照实验分组进行转染，siRNA质粒载体、miRNA抑制剂、miRNA过表达载体均来自上海吉玛基因有限公司，体外实验分组为si-NC、si-circ_0007142、miR-647 NC、miR-647 mimic、si-circ_0007142+inhibitor NC、si-circ_0007142+miR-647 inhibitor、miR-647 mimic+vector、miR-647 mimic+OE-CCR8；体内实验分组为si-NC、si-circ_0007142。制备细胞悬液，植入96孔板中，使用Liopfectamine^{TM}3000转染试剂进行转染，步骤按照试剂盒出厂说明书进行。

1.4 RTFQ–PCR

根据试剂盒要求使用TRIzol试剂提取样本中的总RNA，并对RNA的浓度、纯度进行检测。根据高容量cDNA反转录试剂盒的要求将总RNA合成第一链cDNA。引物由苏州金唯智生物科技有限公司提供（表1）。最后根据RTFQ-PCR试剂盒要求，在7500 Fast实时荧光定量PCR系统上进行检测。相对表达量使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算，U6将miRNA进行标准化，GAPDH将circRNA和CCR8标准化。

表 1 RTFQ–PCR引物序列

Tab. 1 RTFQ-PCR primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
Circ_0007142	GAACTCTGCCTCAGGATGAA	AACGTGTAACCTCGGTACCA
miR-647	TGCGGGTGGCTGCACTCACT	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT
CCR8	ACGATGACCGACTACTACCCT	TTCCACCTCAAAGACTGCTC
GAPDH	TGTTCGTCATGGGTGTGAAC	ATGGCATGGACTGTGGTCAT
U6	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT

1.5 FISH实验

样本在4%多聚甲醛室温下固定30 min，DEPC水洗并干燥，30%H_2O_2+纯甲醇对样本进行处理，再滴加0.25%的HC1溶液，15 min后用DEPC水洗。样本加入蛋白酶K反应20 min，用0.1 mol/L甘氨酸洗液终止反应。PBS水洗后用4%PFA多聚甲醛进行再固定，5 × SSC水洗后加入预杂交液65 ℃反应1 h。加入500 ng/mL digoxigenin-labeled probe探针，暗室中65 ℃温育48 h，用封闭液温育30 min，加入生物素化鼠抗地高辛抗体，37 ℃温育1 h，加入FITC 标记抗体，暗室下37 ℃温育30 min，DAPI染核，封片，荧光显微镜下观察染色结果。

1.6 双荧光素酶报告基因实验

构建circ_0007142与*CCR8*基因的野生型片段，命名为circ_0007142-WT、CCR8-WT，将野生型基因片段使用内切酶位点*Spe* Ⅰ和*Hin*d Ⅲ扩增插入到pmirGLO双萤光素酶报告基因载体上。在circ_0007142-WT、CCR8-WT的野生型片段上设计种子序列的互补序列突变位点，命名为circ_0007142-MUT、CCR8-MUT，利用限制性

内切酶与T4 DNA连接酶将突变型基因片段扩增插入到pmirGLO载体上。将这些报告质粒与miR-647 NC或miR-647 mimic使用Lipofectamine™3000试剂共转染到HEK-293T细胞中，48 h后收集细胞并进行充分裂解，离心后取上清液加入荧光素酶反应试剂，再加入细胞裂解液，最后测量萤火虫荧光素酶活性，并以肾素荧光素酶活性为标准化参考。以上详细步骤均按照试剂盒说明书进行。

1.7 RNA结合蛋白免疫沉淀（RNA-binding protein immunoprecipitation，RIP）实验

应用RIP试剂盒验证circ_0007142与miR-647、CCR8与miR-647的靶向关系。将细胞使用PBS水洗以后，裂解，收集裂解液进行实验，最后使用RTFQ-PCR检测circ_0007142、miR-647、CCR8的丰度。详细实验步骤按照RIP试剂盒出厂说明书进行严格操作。

1.8 Transwell实验

将冷冻的Matrigel基质胶融化，加入无血清培养基进行稀释，稀释液添加到transwell小室的上室，以5×10^4个细胞/孔的密度植入到上室的24孔板中，并添加无血清培养基，下室则添加含有10%胎牛血清的培养基，37 ℃下温育24 h，多聚甲醛固定细胞，0.1%结晶紫染色，在显微镜下观察细胞侵袭数量。

1.9 克隆形成实验

将细胞植入6孔板，每孔5×10^3个细胞，置于培养箱中培养14 d，每3 d更换新培养基。培养结束后经PBS洗涤、乙醇固定后，使用0.5%结晶紫进行染色。最后在显微镜下观察细胞集落形成数量。

1.10 Western blot检测

RIPA裂解液将细胞分离提取蛋白，加入PMSF调整浓度，使用BCA定量试剂盒按照说明书要求检测蛋白浓度；蛋白在10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离，然后将其转移到PVDF膜上，再加入5%脱脂牛奶进行封闭。加入一抗vimentin（1∶2 000）、E-cadherin（1∶500）、N-cadherin（1∶500）、GAPDH（1∶1 000）与膜4 ℃过夜温育，使用TBST进行冲洗，加入HRP标记的山羊抗兔二抗IgG（1∶1 000），室温下温育1 h。加入ECL使蛋白信号可视化，在Image J软件上进行分析。

1.11 免疫组织化学实验

石蜡切片并脱蜡至水，加入3%H_2O_2温育以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水和PBS冲洗，微波抗原修复，血清封闭后加入一抗CCR8，4 ℃温育过夜，PBS冲洗后加入生物素标记的二抗，室温温育30 min后PBS冲洗，DAB显色，自来水冲洗、脱水、透明并封片，显微镜下拍照。借助Image J软件对染色结果进行半定量分析，计算阳性表达率。

1.12 裸小鼠移植瘤实验

BALB/c裸小鼠被安置在无菌环境中饲养。对癌细胞分别转染si-NC、si-circ_0007142，之后再将细胞注射到裸小鼠右侧皮下，每隔4 d测量1次皮下肿瘤体积。35 d以后，注射异氟醚麻醉裸小鼠，断颈处死，取出肿瘤后拍照、测量体积并称重。

1.13 统计学处理

本实验数据采用SPSS 22.0软件完成统计学分析，体外实验重复进行3次，所得结果用$\bar{x}\pm s$表示；两组间符合正态分布则采用t检验，多组间采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 Circ_0007142在胃癌组织和细胞中高表达

通过RTFQ-PCR检测circ_0007142在胃癌组织和细胞中的表达，结果显示，与癌旁组织相比，胃癌组织中circ_0007142显著高表达（$P<0.05$，图1A）。与GES-1细胞相比，胃癌细胞系AGS、SNU-16中circ_0007142的表达都显著升高（P均<0.05，图1B），其中AGS细胞的表达（3.47 ± 0.29）比SNU-16（2.98 ± 0.21）高，因此本研究选择AGS细胞进行后续功能实验。ROC曲线分析显示，circ_0007142可作为胃癌诊断的一个重要指标（AUC=0.859 8，P<0.000 1，图1C）。通过分析circ_0007142的表达与临床病理学特征的相关性可见，circ_0007142高表达与TNM分期和肿瘤浸润深度相关（P均<0.05，表2）。以上实验结果表明，circ_0007142高表达可能与胃癌发展相关。

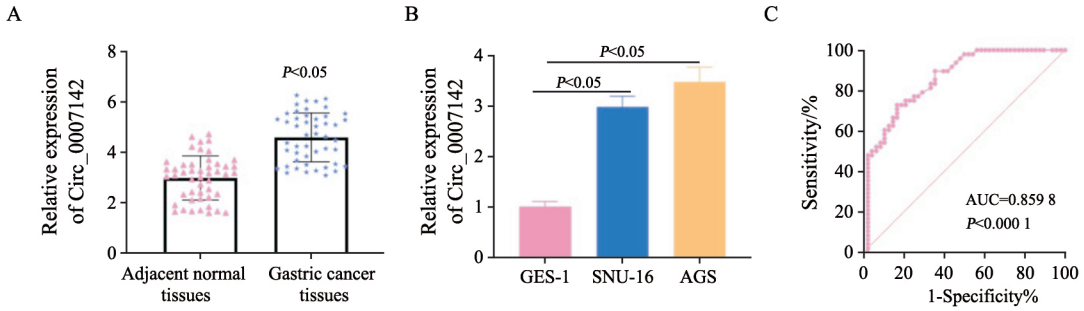

图 1 RTFQ–PCR检测circ_0007142的表达

Fig. 1 RTFQ-PCR was adopted to detect the expression of circ_0007142

A: The expression of circ_0007142 in normal tissues and gastric cancer tissues was detected by RTFQ-PCR; B: The expression of circ_0007142 in GES-1 and gastric cancer cell lines; C: ROC curve analysis revealed the diagnostic value of circ_0007142 in gastric cancer

表 2 Circ_0007142的表达与胃癌患者临床病理特征关系

Tab. 2 Relationship between expression of circ_0007142 and clinicopathological features in patients with gastric cancer

Characteristics	Case *n*	Circ_0007142 expression *n*(%)		*P* value
		High (*n*=26)	Low (*n*=22)	
Gender				0.563
Male	25	15 (60.00)	10 (40.00)	
Female	23	11 (47.83)	12 (52.17)	
Age/year				0.221
<60	32	15 (46.88)	17 (53.13)	
⩾60	16	11 (68.75)	5 (31.25)	
Pathological type				0.146
Adenocarcinoma	22	9 (40.91)	13 (59.09)	
Squamous cell carcinoma	26	17 (65.38)	9 (34.62)	
Tumor size *D*/cm				0.770
>5	20	10 (50.00)	10 (50.00)	
⩽5	28	16 (57.14)	12 (42.86)	
Tumor infiltration				0.002
T_1-T_2	25	8 (32.00)	17 (68.00)	
T_3-T_4	23	18 (78.26)	5 (21.74)	
TNM staging				0.040
Ⅰ-Ⅱ	28	19 (67.86)	9 (32.14)	
Ⅲ	20	7 (35.00)	13 (65.00)	

2.2 敲减circ_0007142抑制胃癌细胞的克隆形成、侵袭和EMT

通过克隆形成实验、transwell、Western blot检测探讨circ_0007142表达水平对胃癌细胞生物学行为的影响。结果表明，与si-NC组相比，si-circ_0007142组细胞的集落形成与侵袭均被抑制（*P*均<0.05，图2A、B）。与si-NC组相比，si-circ_0007142组细胞中vimentin与N-cadherin的蛋白水平均下调，而E-cadherin的蛋白水平上调（均*P*<0.05，图2C）。以上实验说明，敲减circ_0007142的表达能够抑制胃癌细胞的集落形成能力与侵袭，并且抑制EMT的形成，进而参与胃癌的进展。

2.3 在胃癌细胞中，circ_0007142可以吸附miR–647

FISH实验结果显示，circ_0007142在细胞质和细胞核均有表达，但主要定位于细胞质（图3A）。Circular RNA Interactome（https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html）网站中发现miR-647与circ_0007142存在结合位点，同时设计了circ_0007142的突变位点（图3B），之后通过双荧光素酶报告基因和RIP实验验证了miR-647和circ_0007142之间的靶向作用关系，结果显示，与circ_0007142-WT+miR-647 NC组相比，circ_0007142-WT+miR-647 mimic组细胞的荧光素酶活性显著降低（*P*<0.05），而circ_0007142-MUT+miR-647 NC组与circ_0007142-MUT+miR-647 mimic组的荧光素酶活性无显著变化（*P*>0.05）。RIP实验结果显示，与miR-647 NC组相比，circ_0007142在miR-647 mimic组的Ago2抗体上富集更多，circ_0007142与miR-647的靶向关系得到证实（图3C、D）。通过RTFQ-PCR发现miR-647在胃癌组织中表达较正常组织降低（*P* < 0.05，图3E），此外，miR-647在胃癌细胞中的表达较正常细胞同样降低（*P* < 0.05，图3F），胃癌组织中miR-647的表达与circ_0007142呈负相关关系（*r*=-0.7514，

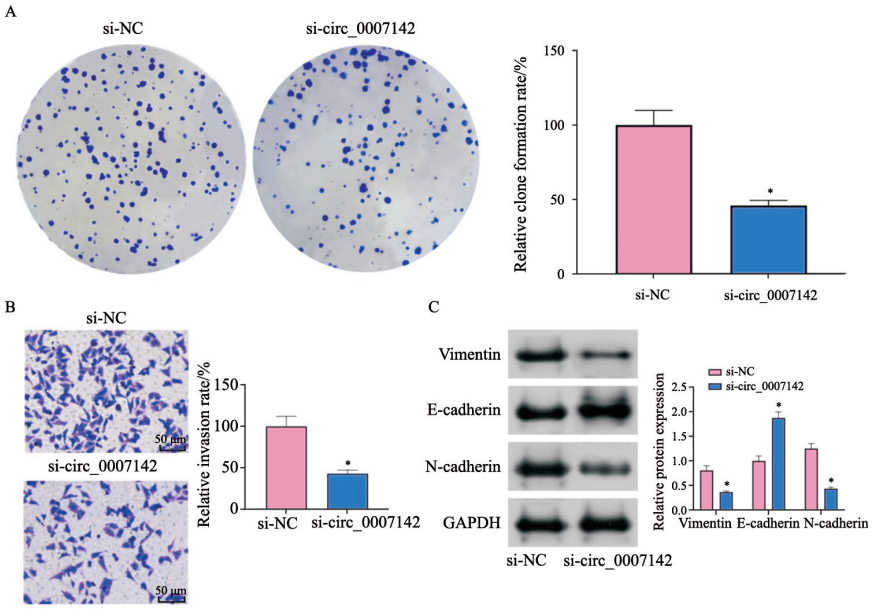

图 2　敲减circ_0007142的表达能够抑制胃癌细胞恶性生物学行为

Fig. 2　Knockdown of circ_0007142 expression inhibits the malignant biological behavior of gastric cancer cells

A: Colony forming ability of cells was detected by clone formation assay; B: Cell migration ability was detected by transwell assay (×200); C: Expressions of EMT related factors were detected by Western blot; $P<0.05$, compared with each other

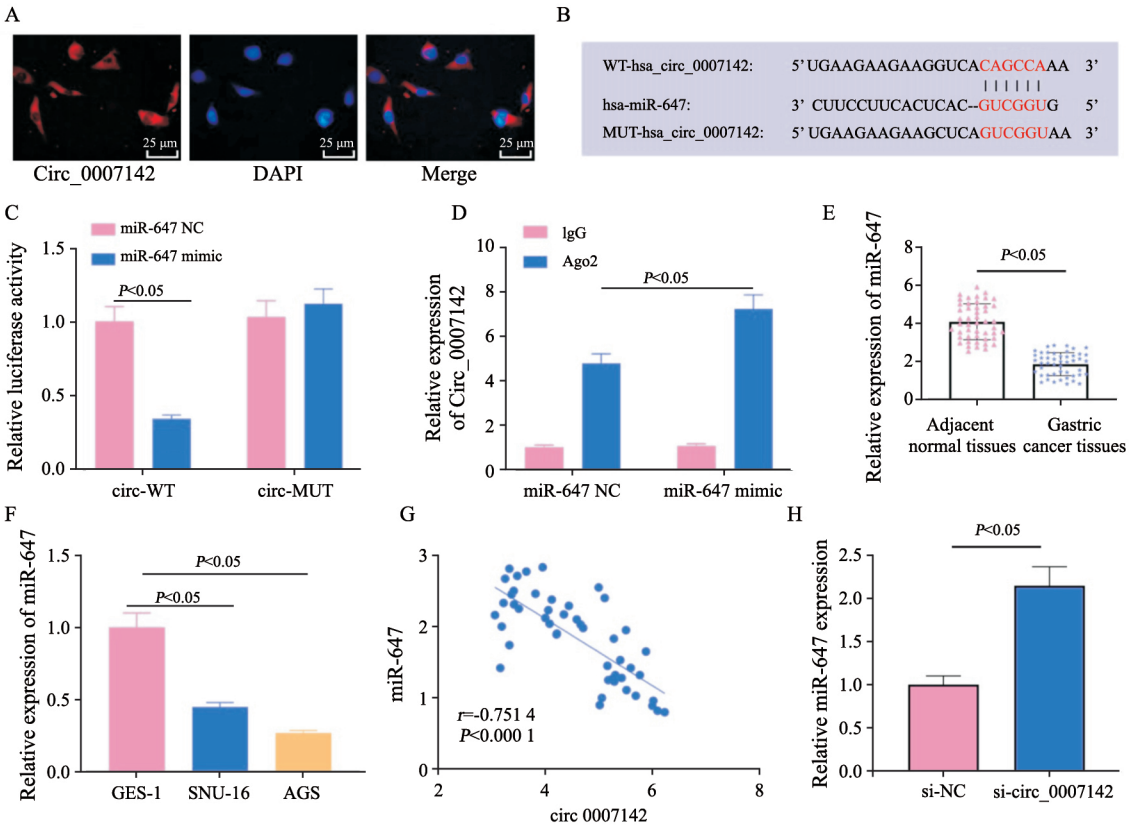

图 3　Circ_0007142可以作为分子海绵吸附miR-647

Fig. 3　Circ_0007142 absorbs the expression of miR-647 as a molecular sponge

A: FISH experiment results (×400); B: The binding sequences between circ_0007142 and miR-647; C: Results of dual luciferase reporter assay; D: Results of RIP experiment; E: Expressions of miR-647 in normal tissues and gastric cancer tissues were detected by RTFQ-PCR; F: Expression of miR-647 in gastric cancer cells was detected by RTFQ-PCR; G: miR-647 and circ_0007142 expressions were negatively correlated; H: The effect of circ_0007142 knockdown on the expression of miR-647 was detected by RTFQ-PCR

$P<0.000\ 1$，图3G），且敲减circ_0007142能够诱导miR-647的表达（$P<0.05$，图3H）。以上实验结果表明circ_0007142可以作为分子海绵吸附miR-647而发挥作用。

2.4 miR-647抑制剂可以部分挽救沉默circ_0007142对胃癌细胞的作用

对circ_0007142通过miR-647调控胃癌细胞的生物学行为进行研究，结果表明si-circ_0007142转染对胃癌细胞的克隆形成、侵袭和EMT有抑制作用，但该作用被miR-647 inhibitor部分挽救（P均<0.05，图4A~C）。

2.5 CCR8是miR-647的下游靶点且在胃癌组织和细胞中表达增强

在TargetScan（http://www.targetscan.org/vert_71/）数据库中发现CCR8与miR-647存在结合位点，同时设计CCR8的突变位点（图5A）。双荧光素酶报告基因实验显示，与CCR8-WT+miR-647 NC组相比，CCR8-WT+miR-647 mimic组细胞的荧光素酶活性下调（$P<0.05$），CCR8-MUT+miR-647 NC组与CCR8-MUT+miR-647 mimic组的荧光素酶活性差异无显著变化（$P>0.05$）。RIP实验结果显示，与miR-647 NC组相比，CCR8在miR-647 mimic的Ago2抗体上富集更多（$P<0.05$）。CCR8与miR-647的互作用关系被证实（图5B、C）。结合GEPIA（http://gepia）数据库与UALCAN（http://ualcan.path.uab.edu/index.html）数据库发现CCR8在胃癌组织中高表达（图5D、E）。RTFQ-PCR和免疫组织化学检测结果显示与网站预测结果一致，CCR8在胃癌组织中的表达高于正常组织（$P<0.05$，图5F、G），在胃癌细胞中也得到同样的结果（P均<0.05，图5H），相关性分析显示，

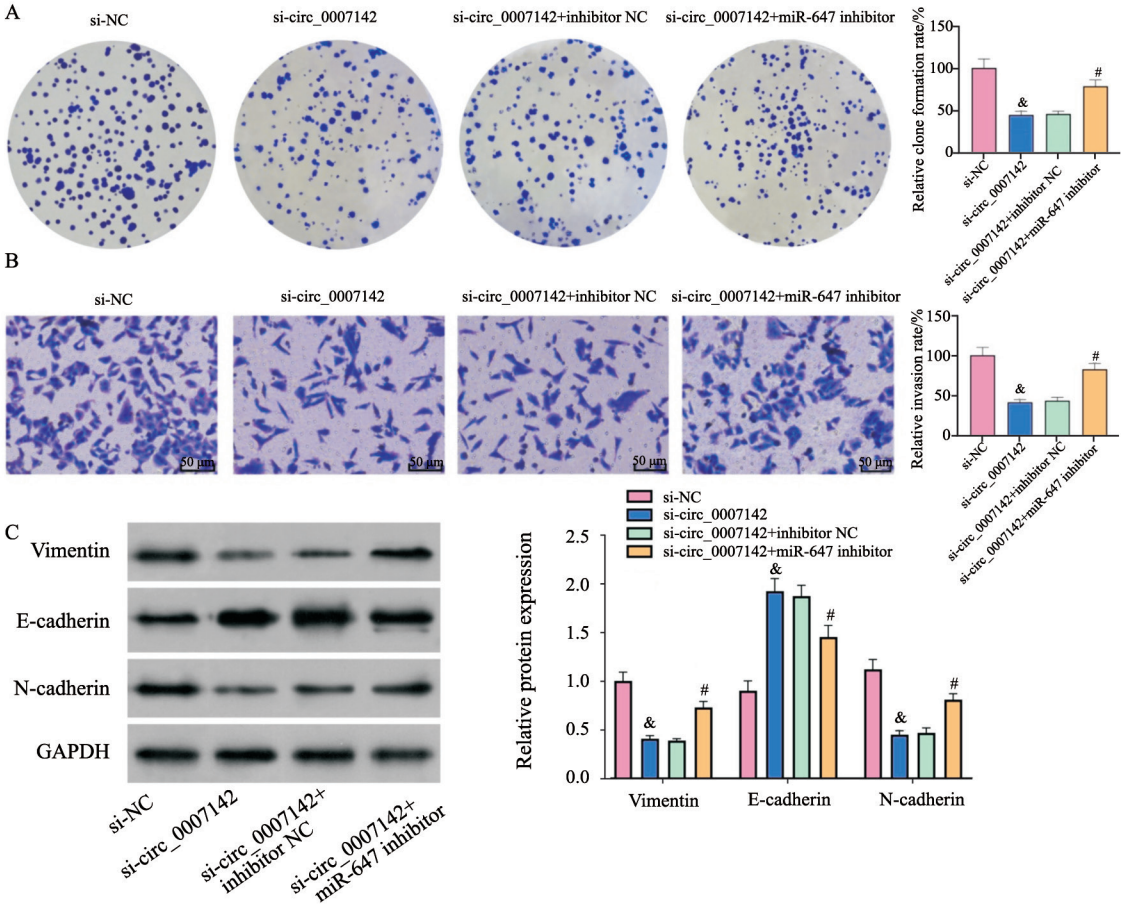

图 4 各组细胞克隆形成、侵袭和EMT相关因子表达

Fig. 4 Clone formation, invasion and expressions of EMT related factors in each group of cells

A: Clone formation results in each group; B: Cell invasion results in each group (×200); C: Protein expressions of EMT related factors in each group. &: $P<0.05$, compared with si-NC group; #: $P<0.05$, compared with si-circ_0007142+inhibitor NC group

CCR8的mRNA表达与miR-647表达呈负相关（$P<0.000\ 1$，图5I）。RTFQ-PCR检测干预miR-647的表达对CCR8的影响，结果显示，过表达miR-647能够显著抑制CCR8的表达（$P<0.05$，图5J）。相对于inhibitor NC组，敲减miR-647的表达能够诱导CCR8表达增强，但该作用被si_circ_0007142部分挽救（P均<0.05，图5K）。以上实验结果说明，CCR8是miR-647的下游靶点，circ_0007142能够作为分子海绵吸附miR-647进而调控CCR8的表达。

2.6 过表达CCR8可以部分挽救上调miR-647对胃癌细胞的作用

通过克隆形成实验、transwell、Western blot实验分析CCR8是否能影响miR-647调控的胃癌细胞生物学行为。结果发现，miR-647 mimic能够抑制胃癌细胞的克隆形成、侵袭和EMT，但该作用被OE-CCR8部分挽救（P均<0.05，图6）。

2.7 敲减circ_0007142可以抑制裸小鼠体内成瘤能力

本研究通过体内实验进一步验证circ_0007142对胃癌的作用。在小鼠体内注射转染了si-NC、si-circ_0007142的癌细胞，结果发现si-circ_0007142组肿瘤的体积和重量均比si-NC组低（$P<0.05$，图7A~C）。以上实验数据说明，敲减circ_0007142可以抑制裸小鼠体内成瘤能力。本研究机制图见图7D。

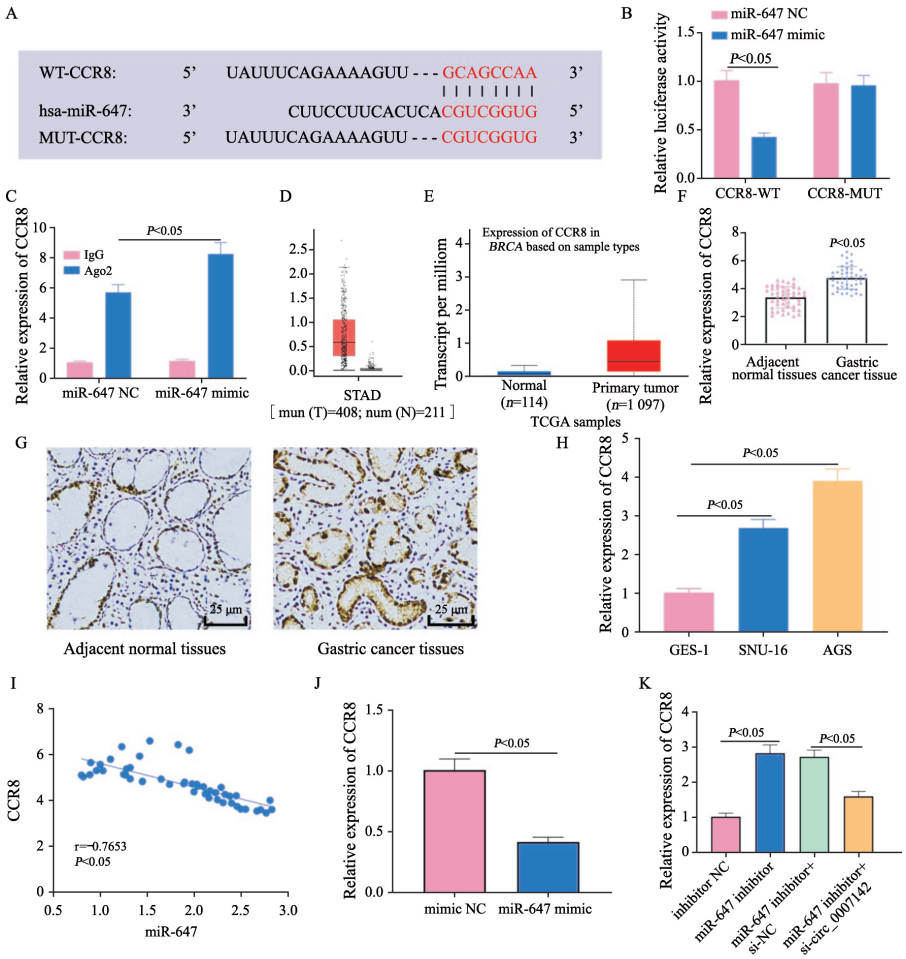

图 5 CCR8是miR-647的下游靶基因且其表达受circ_0007142的调控

Fig. 5 CCR8 was a downstream target gene of miR-647 and its expression was regulated by circ_0007142

A: The binding sequences between miR-647 and CCR8; B: Results of dual luciferase reporter assay; C: Results of RIP experiment; D: GEPIA database showed high expression of CCR8 in gastric cancer tissues; E: UALCAN database showed high expression of CCR8 in gastric cancer tissues; F: The expressions of CCR8 in normal tissues and gastric cancer tissues were detected by RTFQ-PCR; G: CCR8 expressions in normal tissues and gastric cancer tissues were detected by immunohistochemical method (×400); H: CCR8 expression in gastric cancer cell lines was detected by RTFQ-PCR; I: miR-647 and CCR8 expressions were negatively correlated; J: Effect of miR-647 overexpression on CCR8 expression was determined by RTFQ-PCR; K: Effects of miR-647 inhibitor and miR-647 inhibitor combined with circ_0007142 knockdown on the expression of CCR8 were determined by RTFQ-PCR

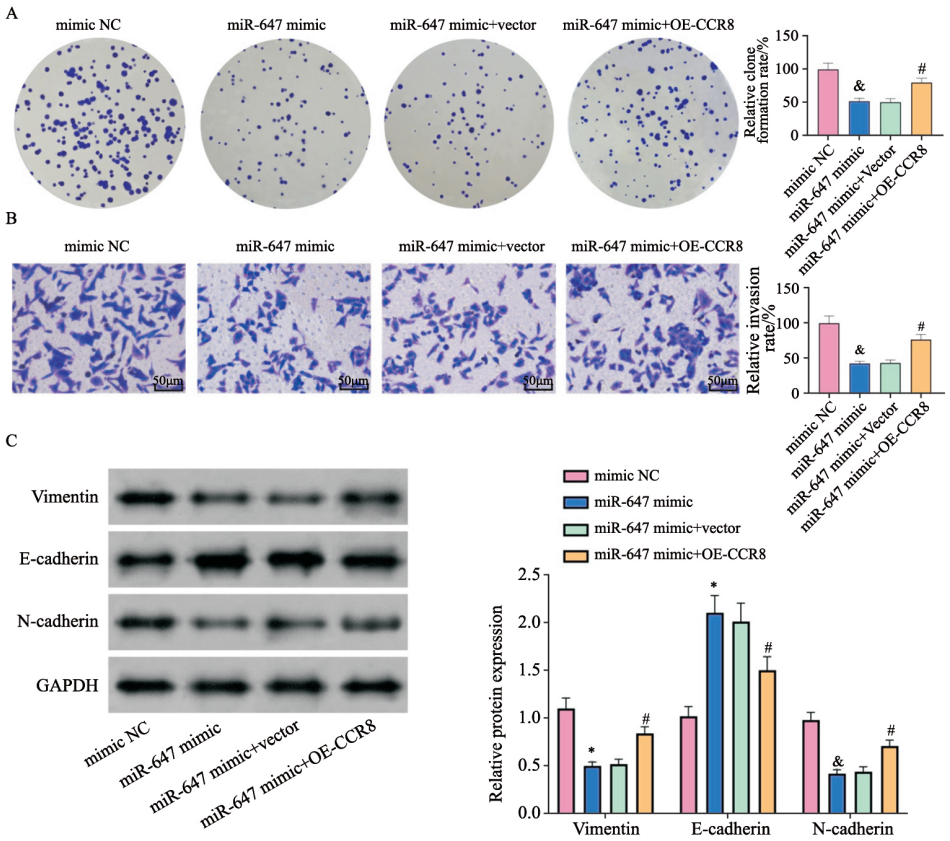

图 6 各组细胞克隆形成、侵袭和EMT相关因子表达

Fig. 6 Clone formation, invasion and expressions of EMT related factors in each group of cells

A: Clone formation results in each group; B: Cell invasion results in each group (×200); C: Protein expressions of EMT related factors in each group; *: $P<0.05$, compared with mimic-NC group; #: $P<0.05$, compared with miR-647 mimic+vector group

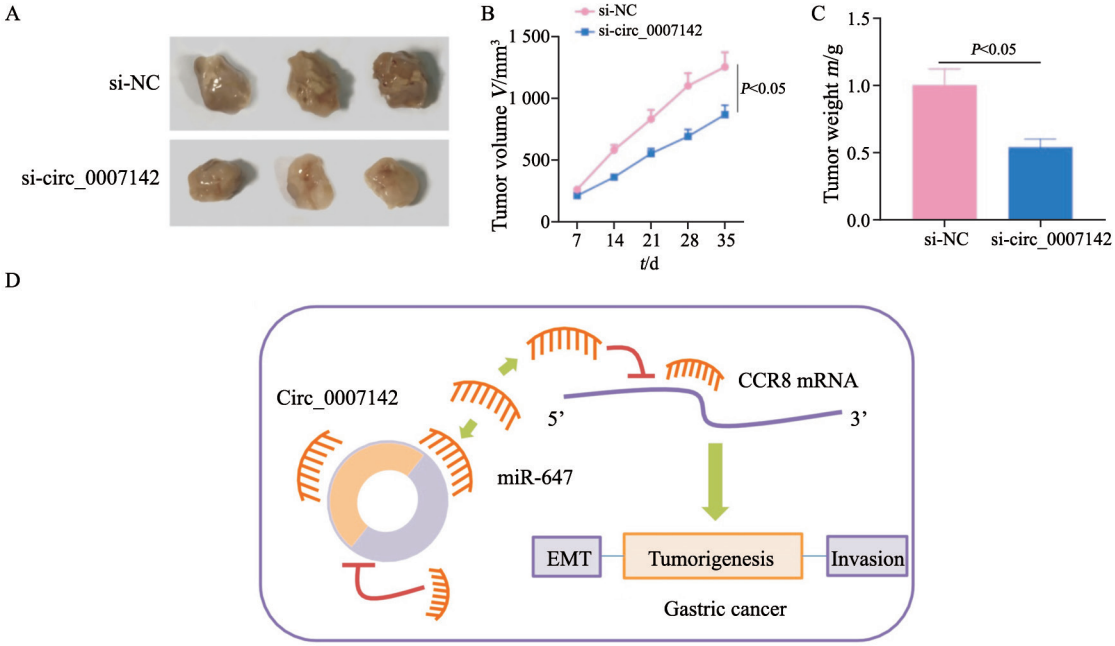

图 7 敲减circ_0007142可以抑制裸小鼠体内成瘤能力

Fig. 7 Knockdown of circ_0007142 inhibits tumorigenesis in nude mice

A: The xenograft tumors from the burdened nude mice were photographed; B: The growth curves of the xenograft tumors were made by the tumor volume; C: The tumor weights of xenografts were quantified

3 讨 论

胃癌的发病机制复杂，细胞生物学、分子生物学等都参与其中，在高通量测序技术与生物信息学分析高速发展的今天，对circRNA在疾病中作用的研究已经成为一大热点。EMT伴随上皮细胞标志物E-cadherin表达被抑制、间充质表型标志物vimentin与N-cadherin表达被促进，这个过程使细胞具有转移和侵袭的能力，对于癌症原发灶转移有重要的意义[16]。

CircRNA在胃癌中关于EMT和侵袭转移的机制已有研究，Jin等[17]经过研究发现，沉默circ_0101145的表达通过调节miR-548c-3p/LAMC2轴抑制肝癌EMT。Circ_0007142作为本次的研究对象，曾被发现在肺腺癌和结直肠癌中均可促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭[18-19]。本研究发现，circ_0007142在胃癌组织中呈高表达，并且功能实验显示，沉默circ_0007142可以抑制癌细胞的集落形成、侵袭和EMT，并且在体内实验中沉默circ_0007142能抑制肿瘤的生长与EMT。通过之前研究得知，circRNA可以与miRNA竞争式结合，下调miRNA的表达。借助生物学信息网站寻找circ_0007142的下游靶点，进一步选中miR-647，并使用双荧光素酶报告基因实验验证二者的靶向关系。miR-647之前被报道在胃癌耐药细胞中低表达，miR-647过表达可以降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力[20]。Cao等[21]通过研究认为miR-647在体内和体外均对胃癌的发展有抑制作用。本研究发现，miR-647在胃癌组织中低表达，并与circ_0007142的表达呈负相关，沉默circ_0007142对胃癌细胞的作用也可以被miR-647抑制剂部分逆转。

分析miR-647的下游靶基因发现，CCR8与miR-647之间具有相互作用。趋化因子是一类信号蛋白，可以诱导细胞定向趋化，参与血细胞发育、血管形成、细胞凋亡等过程，在肿瘤的发展、转移、炎症感染等过程中都发挥着重要作用[22]。在对浸润性膀胱癌的研究中发现，CCR8水平高与免疫耐受相关，高水平的CCR8预示着预后差，化疗效果差[23]。Li等[24]通过研究得出结论，CCR8可以作为预测胃肠道间质瘤的生物标志物，其高表达与恶性程度、不良预后相关。基于此，本研究在生物学网站中检索到CCR8在胃癌组织中高表达，借助实验进一步证实CCR8在胃癌组织中高表达。并且发现，在胃癌组织中，CCR8与miR-647的表达呈负相关，过表达CCR8可以部分抵制上调miR-647带来的影响。

基于以上分析，本次研究证明circ_0007142可能会通过miR-647/CCR8轴参与胃癌的发展，为胃癌的预防与治疗探索到新的有潜力的诊断标志物。

［参 考 文 献］

［1］ XU J Y, LI N, DENG W Y, et al. Long noncoding RNA FER1L4 suppresses proliferation, invasion, migration and lymphatic metastasis of gastric cancer cells through inhibiting the Hippo-YAP signaling pathway［J］. Am J Transl Res, 2020, 12(9): 5481-5495.

［2］ WANG F, LIU T S, YUAN X L, et al. Trastuzumab plus docetaxel and capecitabine as a first-line treatment for HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: a phase Ⅱ, multicenter, open-label, single-arm study［J］. Am J Cancer Res, 2020, 10(9): 3037-3046.

［3］ 张丽娜, 许昕瑜, 郭松佳, 等. 特殊富含AT序列结合蛋白1在胃癌组织中的表达及其对胃癌细胞增殖的影响［J］. 中国免疫学杂志, 2019, 35(9): 1075-1079.
ZHANG L N, XU X Y, GUO S J, et al. Expression of special AT rich sequence binding protein 1 in gastric cancer tissues and its effect on proliferation of gastric cancer cells［J］. Chin J Immunol, 2019, 35(9): 1075-1079.

［4］ WANG C J, GAO F, HUANG Y J, et al. circAkap17b acts as a miR-7 family molecular sponge to regulate FSH secretion in rat pituitary cells［J］. J Mol Endocrinol, 2020, 65(4): 135-148.

［5］ YU W B, MA B, ZHAO W, et al. The combination of circRNA-UMAD1 and Galectin-3 in peripheral circulation is a co-biomarker for predicting lymph node metastasis of thyroid carcinoma［J］. Am J Transl Res, 2020, 12(9): 5399-5415.

［6］ ZHANG H Y, SHEN Y H, ZHANG B R, et al. Hsa_circ_0003829 serves as a potential diagnostic predictor for oral squamous cell carcinoma［J］. J Int Med Res, 2020, 48(9): 030006052093688.

［7］ SHEN D, ZHAO H Y, ZENG P, et al. Circular RNA hsa_circ_0005556 accelerates gastric cancer progression by sponging miR-4270 to increase MMP19 expression［J］. J Gastric Cancer, 2020, 20(3): 300-312.

［8］ WANG Z B, JIANG Z D, ZHOU J, et al. circRNA RNF111 regulates the growth, migration and invasion of gastric cancer cells by binding to miR-27b-3p［J］. Int J Mol Med, 2020, 46(5): 1873-1885.

[9] YIN W Z, XU J, LI C, et al. Circular RNA circ_0007142 facilitates colorectal cancer progression by modulating CDC25A expression *via* miR-122-5p [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 3689-3701.

[10] 郑夏颖, 陈俊霞. 环状RNA hsacirc0005320在三阴性乳腺癌中的表达及其对细胞增殖的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(11): 845-854.
ZHENG X Y, CHEN J X. Expression of circ RNA hsacirc0005320 in triple-negative breast cancer and its effect on cell proliferation [J]. China Oncol, 2019, 29(11): 845-854.

[11] WANG T, WANG J, REN W, et al. CircRNA-0008717 promotes cell proliferation, migration, and invasion by regulating miR-203/Slug in esophageal cancer cells [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(16): 999.

[12] XU J, WU G H, ZHAO Y J, et al. Long noncoding RNA DSCAM-AS1 facilitates colorectal cancer cell proliferation and migration via miR-137/Notch1 axis [J]. J Cancer, 2020, 11(22): 6623-6632.

[13] MA H, WANG P J, LI Y, et al. Decreased expression of serum miR-647 is associated with poor prognosis in gastric cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(7): 2552-2558.

[14] VILLARREAL D O, L'HUILLIER A, ARMINGTON S, et al. Targeting CCR8 induces protective antitumor immunity and enhances vaccine-induced responses in colon cancer [J]. Cancer Res, 2018, 78(18): 5340-5348.

[15] DEUTSCH A J, STEINBAUER E, HOFMANN N A, et al. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma [J]. Mod Pathol, 2013, 26(2): 182-194.

[16] ZHANG Y X, LI Y. Long non-coding RNA NORAD contributes to the proliferation, invasion and EMT progression of prostate cancer via the miR-30a-5p/RAB11A/WNT/β-catenin pathway [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 571.

[17] JIN J L, LIU H, JIN M S, et al. Silencing of hsa_circ_0101145 reverses the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via regulation of the miR-548c-3p/LAMC2 axis [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(12): 11623-11635.

[18] MA D J, LIU H S, QIN Y Z, et al. Circ_0007142/miR-186/FOXK1 axis promoted lung adenocarcinoma progression [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(8): 4728-4738.

[19] WEN T Y, WU H L, ZHANG L, et al. Circular RNA circ_0007142 regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion via miR-455-5p/SGK1 axis in colorectal cancer [J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(1): 22-33.

[20] CAO W L, WEI W Y, ZHAN Z X, et al. Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1958-1966.

[21] CAO W L, WEI W Y, ZHAN Z X, et al. Role of miR-647 in human gastric cancer suppression [J]. Oncol Rep, 2017, 37(3): 1401-1411.

[22] CHEN G, CAI Z D, LIN Z Y, et al. ARNT-dependent CCR8 reprogrammed LDH isoform expression correlates with poor clinical outcomes of prostate cancer [J]. Mol Carcinog, 2020, 59(8): 897-907.

[23] WANG T, ZHOU Q, ZENG H, et al. CCR8 blockade primes anti-tumor immunity through intratumoral regulatory T cells destabilization in muscle-invasive bladder cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(9): 1855-1867.

[24] LI H L, WANG L H, HU Y L, et al. Clinical and prognostic significance of CC chemokine receptor type 8 protein expression in gastrointestinal stromal tumors [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(31): 4656-4668.

（收稿日期：2020-12-01 修回日期：2021-02-26）