

学校代码	10285
学号	20164021005

苏州大学
SOOCHOW UNIVERSITY
博士学位论文
(学术学位)



论 文 题 目 HBV 编码的 circRNA 的鉴定及功能研究

题目英文翻译 Identification and function of circRNA encoded by HBV

研 究 生 姓 名 朱 敏

指导教师姓名 贡成良

专 业 名 称 药理学

研 究 方 向 生物制药

所 在 院 系 基础医学与生物科学学院

论文提交日期 2019 年 3 月

苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

论文作者签名： 杨 日期： 2019.3.13

苏州大学学位论文使用授权声明

本人完全了解苏州大学关于收集、保存和使用学位论文的规定, 即: 学位论文著作权归属苏州大学。本学位论文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。苏州大学有权向国家图书馆、中国社科院文献信息情报中心、中国科学技术信息研究所(含万方数据电子出版社)、中国学术期刊(光盘版)电子杂志社送交本学位论文的复印件和电子文档, 允许论文被查阅和借阅, 可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编学位论文, 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索。

涉密论文 ☐

本学位论文属

在____年____月解密后适用本规定。

非涉密论文 ☒

论文作者签名: 杨敏 日期: 2019.3.13

导师签名: 夏心平 日期: 2019.3.13

中文摘要

为了理解全转录组 (mRNAs、miRNAs 和 circRNAs) 水平细胞对乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 的感染应答, 从全转录组水平探讨 HBV 感染在 HBV 相关肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 方面的作用及机制。本研究采用高通量测序技术, 分析了 HepG2 细胞系 (n=2) 和 HBV 阳性的 HepG2.2.15 细胞系 (n=2) 的 RNA 表达模式。与 HepG2 细胞相比, 10114 (6452) 个基因在 HepG2.2.15 细胞中上 (下) 调, 37 (33) 个 miRNA 上 (下) 调。另外, 在 HepG2 中 HepG2.2.15 分别发现 5672 和 13026 个 circRNA, 其中 186 (65) 个 circRNA 在 HepG2.2.15 中上 (下) 调 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$), 说明 HBV 感染导致细胞 mRNA、miRNA 和 circRNA 表达模式发生明显变化。用临床肝癌组织样本对体外肝癌细胞中的差异表达的 mRNA 和 circRNA 进行了验证, 结果显示临床肝癌组织样本中 mRNA 的表达水平的变化与体外肝癌细胞系基本一致。另外, 通过对 HBV 阳性细胞 HepG2.2.15 细胞系中差异表达的 mRNAs、miRNAs 和 circRNAs 的整合分析, 构建了 HBV 阳性细胞内的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络, 发现 circRNA circ_FIRRE 1 (chrX: 130870155~130928494) 分别与 NovelmiRNA-631 和 NovelmiRNA-969 相互作用, 调控 86 和 22 条 mRNAs 的水平; circRNA circ_FIRRE 2 (chr 11: 22696396-22777499) 与 NovelmiRNA-323 相互作用调控 22 条 mRNAs 的水平。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, circRNA-miRNA-mRNA 调控网络中的靶基因主要富集在蛋白结合, 肿瘤形成和抗病毒信号转导等途径中。HBV 感染改变了肝癌细胞中 RNA 的表达模式, 为理解 HBV 相关性肝癌的发生、发展提供了新的线索。

目前已发现部分 DNA 病毒的转录本可以通过反向剪接形成 circRNAs, 为了求证 HBV 是否能形成 circRNA, 将 HBV 阳性肝癌细胞 HepG2.2.15 的 circRNA 测序数据与 HBV 病毒基因组数据进行比对, 发现 1 条 HBV 可能编码的 circRNA, 其序列与基因组上 489-2985 nt 区域匹配, 长度约 2.5 kb, 命名为 HBV_circ_1。为了鉴定 HBV 编码 circRNA 的真实性, 利用发散引物进行反向 PCR, PCR 产物的 Sanger

测序结果显示, HBV 起源的 circRNA HBV_circ_1 的确存在剪接的 Junction site, 且其侧翼序列与高通量测序结果一致。利用靶向 Junction site 的寡核苷酸探针进行 Northern blotting 检测, 进一步确认 HepG2.2.15 细胞中存在 HBV_circ_1。组织原位杂交结果显示, HBV_circ_1 也存在于 HBV 相关肝癌临床样本中。比较 HBV pgRNA (pre-genomic RNA) 与 HBV_circ_1 序列, 推测 HBV_circ_1 起源于 pgRNA, 是 HBV 编码的一个新 RNA 分子。此外, 组织芯片分析结果显示, HBV_circ_1 在肝癌组织中的表达水平显著性地高于癌旁组织, 暗示 HBV_circ_1 可能参与肝癌的发生和/或发展。

为了探讨 HBV_circ_1 的功能, 利用流式细胞术研究了 HBV_circ_1 对肝癌细胞表型特征的影响, 结果显示, HBV_circ_1 促进 HepG2 细胞的增殖、细胞周期进程、细胞迁移, 抑制肝癌细胞凋亡。RNA pull-down 和双荧光素酶基因报告系统实验显示, HBV_circ_1 能与 hsa-miRNA-6124 互作调节肿瘤抑制基因 (Suppression of tumorigenicity 7, ST7, GenBank: AK297510.1) 表达, 推测肝癌的发生和/或发展受到 HBV_circ_1-hsa-miRNA-6124-ST7 网络的调节。RNA pull-down、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RIP) 结合质谱分析对 HBV_circ_1 的结合蛋白进行了鉴定, 发现 HBV_circ_1 能与周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinases 1, CDK1)、真核翻译延伸因子 (Elongation factor 1-alpha 1, EEF1A1) 等多种蛋白互作。细胞免疫荧光及 Western blotting 进一步证实, HBV_circ_1 能与 CDK1、EEF1A 互作, 暗示 HBV_circ_1 有可能通过与蛋白互作调节肝癌细胞的表型特征。此外, 我们还发现 HBV_circ_1 可促进 HBV 复制, 提高细胞 CDK1 蛋白水平。表明 HBV 能产生功能性 HBV_circ_1, 通过 HBV_circ_1-hsa-miRNA-6124-ST7 网络、与 CDK1 和 EEF1A 互作, 在 HBV 相关肝癌发生、发展方面扮演重要角色, HBV_circ_1 有可能成为治疗 HBV 患者的分子靶点。

为进一步理解 HBV_circ_1 的功能, 我们从全基因组水平研究了 HBV_circ_1 对细胞基因表达模式的影响, 结果显示, 在表达 HBV_circ_1 的 HepG2 细胞中, 共鉴定出 147 个差异表达基因。与对照细胞相比, 有 57 个基因表达上调, 90 个基因表达下调。差异表达基因的注释结果显示, 差异表达基因富集在 PIK-Akt、

MAPK 和 Hippo 等与肿瘤相关的信号通路上。此外,在 HBV_circ_1 过表达的 HepG 2 细胞中,基因融合及基因剪接事件均发生了改变。这些结果为全面了解 HBV_circ_1 在 HBV 相关的肝细胞癌中的作用提供了线索。

关键词: 乙肝病毒, 环状 RNA, 全转录组, 肝癌

作 者: 朱 敏

指导老师: 贡成良

Identification and function of circRNA encoded by HBV

Abstract

In order to understand the cellular response to HBV infection, and to further investigate the mechanism of HBV infection in HBV-associated HCC at whole transcriptome (mRNAs, miRNAs and circRNAs) level, whole transcriptome sequencing was conducted to characterize the expression profiles of RNAs in HepG2 (n=2) and HBV-positive HepG2.2.15 (n=2) hepatocellular carcinoma cell lines, and correlated expression networks of circRNAs-miRNA-mRNA were constructed. Compare to HepG2 cell line, 10114 (6452) gene expression were up(down)-regulated, 37 (33) miRNAs were up(down)-regulated in HepG2.2.15. Moreover, 5672 and 13026 circRNAs were found in HepG2 and HepG2.2.15, respectively, 186 (65) up (down)-regulated ($P < 0.05$ and $FDR < 0.05$) in HepG2.2.15. GO analysis showed that the hosting genes of dysregulated circRNAs were mainly enriched into cellular processes, biological regulation, metabolic regulation and catalytic activity. KEGG analysis revealed that the hosting genes of dysregulated circRNAs were mainly involved in p53 signaling pathway, pathways in cancer, viral carcinogenic, Ras signaling pathway, mTOR signaling pathway etc. Based on the correlation analysis between the differentially expressed circRNAs, miRNAs and mRNAs, 86 and 22 mRNAs could be regulated by interaction of circRNA (circ_FIRRE1,chrX:130870155-130928494) with NovelmiRNA-631 and NovelmiRNA-969, 22 mRNAs could be regulated by interaction of circRNA (circ_FIRRE2,chr11:22696396-22777499) - NovelmiRNA-323, these co-expressed genes in circRNA-miRNA-mRNA network were mainly enriched in positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter and cytoplasm and protein binding GO terms, and carcinogenic and antiviral signaling pathways KEGG pathways. These findings suggest that HBV infection changes the expression pattern of RNA hepatocellular carcinoma cell, and provided a novel clue to understand the HBV-related HCC.

At present, it has been found that transcripts of some DNA viruses can form

circRNA by back-splicing. In order to verify whether HBV can form circRNA, the circRNA sequencing of HBV-positive HepG 2.2.15 hepatocarcinoma cells and HBV virus genome data were compared with HBV genome. It was found that there is a possible circRNA encoded by HBV, and its sequence matches the 489-2985 nt region of HBV genome. The circRNA is about 2.5 kb and was named HBV_circ_1. To further identify the authenticity of circRNA encoded by HBV, reverse PCR was performed with divergent primers. The results of Sanger sequencing of PCR products show that there is indeed a spliced junction site in HBV_circ_1 and its paralogous sequence is consistent with that of high throughput sequencing. The presence of HBV_circ_1 in HepG2.2.15 cells was further confirmed by Northern blotting with oligonucleotide probe targeting the junction site. Tissue in situ hybridization showed that HBV_circ_1 was also present in clinical samples of HBV related HCC. Comparing HBV pgRNA and HBV_circ_1 sequence, it is suggested that HBV_circ_1 originated from pgRNA, as a new RNA molecule encoded by HBV. Moreover, the results of tissue microarray analysis showed that the expression level of HBV_circ_1 in HCC tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues, suggesting that HBV_circ_1 might be involved in the carcinogenesis and / or development of HCC.

To investigate the function of HBV_circ_1, the effects of HBV_circ_1 on the phenotypic characteristics of HCC cells were detected by flow cytometry. The results showed that HBV_circ_1 promoted the proliferation, cell cycle progression and cell migration of HepG2 cells, and the apoptosis was inhibited. RNA pull-down and dual-Luciferase reporter assay system showed that HBV_circ_1 could interact with hsa-miRNA-6124 to regulate the expression of ST7 (Suppression of tumorigenicity 7, GenBank: AK297510.1), suggesting that the occurrence and / or development of HCC is regulated by HBV_circ_1-hsa-miRNA-6124-ST7 network. Furthermore, the binding proteins of HBV_circ_1 were identified by RNA pull-down, RNA binding protein immunoprecipitation assay and mass spectrometry. It was found that HBV_circ_1 could interact with CDK1 (cyclin-dependent kinases 1, CDK1), eukaryotic translation extension factor (Elongation factor 1-alpha 1, EEF1A1) and other proteins. Cellular immunofluorescence and western blotting further confirmed that HBV_circ_1 could interact with CDK1 and EEF1A1. These results suggested that HBV_circ_1 may regulate the phenotypic characteristics of HCC cells by interacting with proteins. In addition, we also found that HBV_circ_1 could promote HBV replication and increase

the level of CDK1 protein. These results suggest that HBV can produce functional HBV_circ_1, which plays an important role in the development and development of HBV-related HCC through HBV_circ_1-hsa-miRNA-6124-ST7 network and interacting with CDK1 and EE1A. HBV_circ_1 may be a molecular target for the treatment of HBV patients.

To further understand the function of HBV_circ_1, we studied the effect of HBV_circ_1 on the expression pattern of cellular genes at the whole genome level. The results showed that a total of 147 differentially expressed genes were identified in HepG 2 cells over-expressing HBV_circ_1. Compared with the control cells, 57 genes were up-regulated and 90 genes were down-regulated. Annotation of differentially expressed genes showed that differentially expressed genes were enriched in tumor-related signaling pathways, such as PIK-AKT, MAPK and Hippo. In addition, gene fusion and alternative splice events were both changed in HepG 2 cells over-expressing HBV_circ_1. These results provide a clue to understand the role of HBV_circ_1 in HBV-related hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatitis B virus, circular RNA, whole transcriptome, hepatocellular carcinoma

Written by: Min Zhu

Supervised by: Chengliang Gong

目 录

第一章 文献综述	1
1 CircRNA 研究进展	1
1.1 CircRNAs 简述	1
1.2 CircRNAs 生物学功能研究	2
1.3 circRNA 与肝脏疾病的研究进展	6
2 HBV 乙肝病毒概述	8
3 病毒非编码 RNA 研究进展	10
参考文献	12
第二章 研究目的和内容	20
1. 研究目的意义	20
2. 研究内容	20
2.1 利用高通量测序技术从全转录组水平检测 HepG 2 细胞对 HBV 感染的 应答	20
2.2 HBV 编码的 circRNA 筛选与鉴定	20
2.3 HBV_circ_1 的生物学功能及其分子机制探究	20
2.4 构建 HBV_circ_1 过表达肝癌细胞,通过 RNA-seq 技术检测 HBV_circ_1 对肝癌细胞 mRNA 表达模式的影响。	21
3. 研究技术路线	22
第三章 全转录组水平 HepG 2 细胞对 HBV 感染的应答	23
1. 引言	23
2. 材料与方法	24
2.1 生物材料	24
2.2 实验试剂	25
2.3 总 RNA 提取	25
2.4 全转录组测序	25
2.5 测序数据的评估	25

2.6 Clean reads 基因组比对分析	25
2.7 mRNA 测序数据处理分析.....	25
2.8 小 RNA 测序数据处理分析.....	27
2.9 circRNA 测序数据处理分析.....	28
2.10 Real-time PCR.....	29
2.11 数据分析	30
3. 结果与分析	30
3.1 HBV 感染后肝癌细胞 RNAs 表达模式概述.....	30
3.2 差异表达基因主要参与 RNA 降解、细胞周期和 p53 信号通路.....	32
3.3 差异表达 miRNAs 的靶基因主要富集于与癌症相关的信号通路中。	34
3.4 差异表达 circRNAs 的亲本基因主要参与癌变、细胞抗病毒和细胞炎症相关的信号通路	37
3.5 circRNA-miRNA-mRNA 网络调控癌症相关和抗病毒相关的信号通路	40
4.讨论	43
参考文献	45
第四章 来源于 HBV 的 circRNA 的鉴定	49
1 前言	49
2 材料与方法	51
2.1 实验试剂	51
2.2 高通量测序技术分析及数据质量控制	52
2.3 HBV 编码的 circRNAs 预测.....	52
2.4 反向 PCR.....	52
2.5 Northern blotting	52
2.6 组织芯片免疫荧光	53
2.7 地高辛标记探针制备	54
2.8 原位杂交	54
2.9 Real-time PCR 验证临床组织样本中 HBV_circ_1 的表达水平	55
2.10 数据处理	55
3 结果与分析	56

3.1	HBV 可编码 HBV_circ_1	56
3.2	HBV_circ_1 在肝癌组织中表达水平高于癌旁	59
4	讨论	61
	参考文献	62
第五章	HBV_circ_1 生物学功能及其分子机制探究	65
1	前言	65
2	材料与方法	66
2.1	实验材料	66
2.2	HBV_circ_1 过表达载体构建	67
2.3	体外构建 HBV_circ_1	68
2.4	细胞表型特征检测	69
2.5	RNA pull-down （筛选互作 miRNA）	70
2.6	双荧光素酶载体构建及荧光素酶活性检测	72
2.7	siRNA 干扰沉默 HBV_circ_1 表达	73
2.8	RNA pull-down 筛选 circRNA 互作蛋白	73
2.9	蛋白与 HBV_circ_1 在细胞中的共定位免疫荧光	75
2.10	RIP （RNA Immunoprecipitation）实验	75
2.11	Western blotting	76
2.12	Real-time PCR 检测 ST7、HBV P 基因表达水平	77
2.13	数据分析统计	77
3	结果与分析	78
3.1	体外转录法构建的 HBV_circ_1 及 HBV_circ_1 表达载体鉴定	78
3.2	HBV_circ_1 影响肝癌细胞表型特征	80
3.3	HBV_circ_1/hsa- miRNA-6124/ST7 调节网络	83
3.4	HBV_circ_1 调控 ST7 的表达水平	86
3.5	HBV_circ_1 相互作用蛋白的筛选与鉴定	88
3.6	HBV_circ_1 能上调 CDK1 的蛋白水平	93
3.7	HBV_circ_1 促进 HBV 病毒基因表达	95
4	讨论	96

参考文献	98
第六章 HBV_circ_1 能调节肝癌细胞 HepG 2 的基因表达模式	101
1 前言	101
2.材料与方法	102
2.1 细胞准备	102
2.2 mRNA-sequencing	102
2.3 mRNA 表达水平分析.....	102
2.4 差异表达 mRNA 的筛选.....	102
2.5 差异表达 mRNA 的 GO 和 KEGG 富集分析.....	102
2.6 基因融合事件分析	102
2.7 基因可变剪切分析	103
2.8 Real-time PCR.....	103
2.9 数据统计分析	103
3 结果与分析	103
3.1 HBV_circ_1 改变肝癌细胞 HepG2 的基因表达模式	103
3.2 差异表达基因主要参与的信号通路	105
3.3 基因融合事件受 HBV_circ_1 调节.....	107
3.4 HBV_circ_1 调节基因可变剪切.....	109
4 讨论	110
参考文献	112
第七章 结论与创新点	115
附录一	116
附录二	118
附录三	119
附录四 RNA pull-down 产物质谱	121
附录五 载体图谱	123
附录六 原始数据	125
在校期间发表论文情况	126
致 谢	128

第一章 文献综述

1 CircRNA 研究进展

1.1 CircRNAs 简述

环状 RNA 分子 (Circular RNAs, circRNAs) 是非编码 RNA (ncRNA) 中的一类, 其不具有 5'末端帽子和 3'末端 poly (A) 尾巴, 并且通过共价键形成的闭合环状的非编码 RNA 分子。人类最早发现的闭合、单链、环形的 RNA 分子是感染植物的类病毒 (Viroids) 以及感染人的丁型肝炎病毒 (hepatitis delta virus, HDV) 基因组^{[1][2]}。随着高通量测序技术的进步, 在小鼠, 果蝇, 斑马鱼, 人和水稻等真核生物的细胞中也发现了大量内源性 circRNA 转录本^[3]。这种环状序列在细胞内和细胞外环境中都能保持高度的稳定性^[10], 并且它们具有特定的功能, 如调控转录、介导细胞间传递信息以及翻译表达蛋白^[11]。CircRNAs 可以通过基因的外显子、内含子、基因间区域、反义区或非翻译区的反向剪接形成的^[12], 反向剪接过程涉及下游剪接供体和上游剪接受体之间的序列环化^[15]。根据 circRNAs 起源, 其主要分为三类: 外显子环 RNA (EcircRNAs)、外显子内含子环 RNA (EIciRNAs) 和环状内含子 RNA (ciRNAs)^[16], 这三种 circRNAs 是由不同的环化机制产生的 (图 1.1), 包括内含子互补配对, 套索驱动中环化, 内含子环化和 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 驱动中环化^[17]。目前已鉴定的 circRNAs 中起源于外显子的占大多数^[18]。在不同的条件下, circRNAs 的表达水平不同, 提示不同的因子参与了 circRNAs 的形成。在人表皮-间充质转换 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 过程中观察到了 circRNA, 并具有 EMT 的相关功能可影响间充质细胞特性。近三分之一的这些 circRNAs 的产生受到 RNA 结合蛋白 Quaking 的动态调控, Quaking 在 circRNA 的形成过程中起促进作用^[19]。另外, 免疫因子 NF90/NF110 与双链 RNA 结合域亲和力强, 内含子互补序列结构稳定, 促进了 circRNA 在细胞核中的形成。在病毒感染的情况下, NF90/NF110 从 circRNA 复合物中释放出来, 并与病毒 mRNA 结合, 从而导致 NF90/NF110 从细胞核转移到细胞质, 进而导致 circRNA 表达量减少^[20]。此外, FUS 蛋白可以通过与反向剪接连接侧的内含子结合来调节 circRNA 的生物发生过程^[21], 异质核蛋白 L (HNRNPL) 也通过反向剪

接参与了 circRNA 的形成^[22]。之前, 受到传统分子生物学技术方法的限制, 对 circRNA 的认识存在误区, 一直以来, circRNA 都被认为是 RNA 剪接的副产物, 由 mRNA 形成过程中的一个错误剪接引起的^[23], 而且大多数 circRNAs 表达水平比较低与其相对应的线性转录本相比转录本通常在相对于其相应的线性 RNAs 的低水平上表达, 但据最新报道, 一些 circRNAs 的表达丰度比它们的线性 RNA 更高^[24]。最近, 研究显示了 circRNAs 在组织和器官发育中广泛分布^{[25][26]}。尽管有关 circRNA 的研究历史较短, 但已证实部分发现的 circRNA 分子具有 (micro RNA, miRNA) 海绵作用、与 RNA 结合蛋白 (RNA binding proteins, RBPs) 互作、参与基因转录、剪接调控等多种生物学功能, 并在细胞增殖、分化、存活、衰老等许多生命过程和多种疾病的发生中发挥非常重要的作用^{[24][27][28]}。

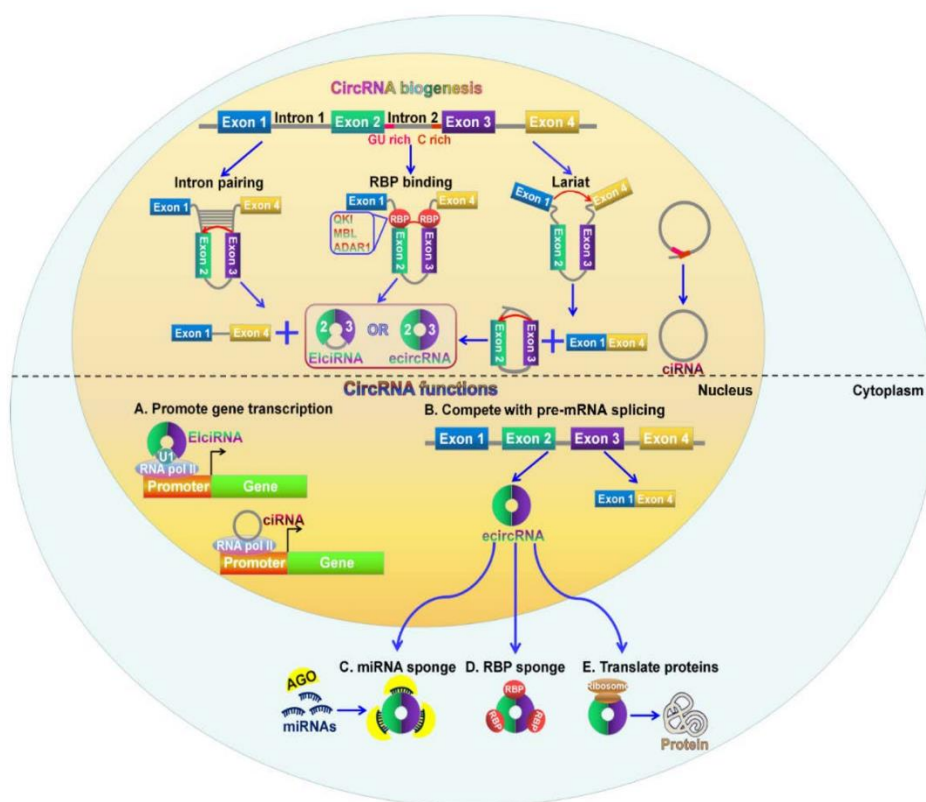


图 1.1 CircRNAs 形成机制及生物学功能^[11]

Figure 1.1 Formation mechanism and biological functions of circRNAs

1.2 CircRNAs 生物学功能研究

CircRNA 已成为 (non-coding RNA, ncRNA) 研究领域中的研究热点, 它的

生物学功能已经得到了广泛的研究。CircRNAs 的生物学功能主要可分为五个方面：充当 miRNA 海绵体以抑制其功能，充当转录和翻译调节器调控因子从而调控亲本基因的表达，影响 pre-mRNAs 的选择性剪接，与蛋白质结合从而抑制蛋白活性、募集蛋白质复合体的组分或调控蛋白质的活性，作为模板翻译蛋白质。

1.2.1 CircRNAs 充当 miRNA 的海绵

竞争性内源 RNA (competitive endogenous, ceRNA) 含有 miRNA 应答元件 (microRNA response element, MRE)，可通过 MRE 竞争性结合 miRNA。因此，ceRNA 可以影响 miRNA 调节基因表达的功能。近来，大量研究表明 circRNA 可充当 miRNA 的海绵体起到 ceRNA 的作用。例如，研究显示，外显子来源的 ciRS-7/CDR1as (miR-7 或 CDR1 的环状 RNA 海绵) 和来源于性别决定域 Y (sexdetermination region Y, SRY) circRNA 都可以结合 miRNA，从而使得 miRNA 的靶基因逃脱降解，所以说 circRNAs 是生物体内很好的 ceRNA 替代者。Hansen 等人发现脑降解相关蛋白 1 (cerebellar degeneration-related protein 1, CDR1) 可翻译产生一个名为反义脑降解相关蛋白 1 的天然环化转录子 (cerebellar degeneration-related protein 1 transcript, CDR1as)。CDR1as 可与 miRNA 结合，并且可由 miR-671 (micro RNA-671) 降解。研究证实 miR-671 可与 CDR1as 完全互补并引起其降解。进一步研究证实 CDR1as 含有多达 70 个 miR-7 的结合位点，并且能与大量阿格蛋白 (argonaute, AGO) 结合。这些结合位点间的互补性增强了 CDR1as 的稳定性，使其免于降解以及其与 miR-7 结合，另外，沉默 CDR1as 或者过表达 miR671 也能引起 miR-7 靶基因表达降低^[29]。此外，在神经组织中 CDR1as 呈高表达，Memczak 等人在斑马鱼胚胎中高表达 CDR1as，沉默 CDR1，结果显示斑马鱼中脑体积减小。研究人员同时模拟了 miR-7 功能缺失，结果表明 miR-7 功能缺失引起了斑马鱼中脑形态缺陷，这些研究结果充分证明 CDR1as 对 miR-7 的海绵作用^[12]。Zheng Qiupeng 等人发现人细胞中环 RNA circHIPK3 作为 miRNA 海绵能吸附 miR-124 从而调控细胞生长^[30]。沉默 circHIPK3 而 HIPK3 mRNA 表达水平不发生改变的情况下细胞生长被显著抑制。双荧光素酶报告系统实验证明了 circHIPK3 可以吸附 9 种 miRNAs，并且还包含 18 个可能的 miRNA 结合位点。其中，circHIPK3 直接与 miR-124 结合，抑制 miR-124 活性。研究结果表明：来源于前体 mRNA 的 circRNA 在人体细胞中具有调控作用。

1.2.2 CircRNAs 能调节 pre-mRNA 剪接

外显子环化的 circRNA 可以与经典的 pre-mRNA 剪接相竞争, Ashwal-Fluss 等研究发现这一现象在人与果蝇中具有组织特异性并且十分保守。“muscleblind”蛋白 (MBL) 与 circRNA 形成相关, MBL 能促进 muscleblind 第二外显子环化形成环 RNA circMbl, 而 circMbl 上与侧翼内含子一样也具有 MBL 结合位点, MBL 能与自身 RNA 产生的 circRNA 特异性的结合, 从而反向调节 circMbl 的合成。在果蝇和人细胞内提高有效的线性剪接就能减少 circMbl 的生成, 证明外显子环化能和经典的 pre-mRNA 剪接相竞争, 使得环化与线性剪接处于一个平衡的状态。表明 circRNA 可以调节 pre-mRNA 的剪接, 从而影响蛋白质的生成^[31]。

1.2.3 CircRNAs 能调控亲本基因的表达

外显子环化形成的 circRNA 定位于细胞质中, 但一些 circRNA 在细胞核内含量十分丰富, 它们能通过与聚合酶 II 相互作用以顺式作用方式调控宿主转录活性。Li 等在人类细胞中发现了另外一种可与聚合酶 II 相互作用的 circRNA, 这种外显子环化的环状 RNA 保留了两个外显子之间的内含子, 所以叫做外显子-内含子环 RNA (EIciRNAs)。EIciRNAs (例如 circEIF3J, circPIAP2) 主要定位于核内, 可与小核糖核蛋白颗粒 U1 亚基 (small ribonucleoprotein particle U1 subunit, U1 snRNP) 的相互作用从而促进亲本基因的转录^[32]。与之类似, Li 等发现 circ-ITCH 及 ITCH 的 3'UTR 区有相同的 miRNA 结合位点。进一步研究表明, miR-7、miR-17 和 miR-214 能被 circ-ITCH 招募从而上调 ITCH (Itchy E3 ubiquitin protein ligase, ITCH) 表达水平^[26]。

1.2.4 能与蛋白结合, 抑制蛋白活性、募集蛋白复合体的组分或调控蛋白的活性

CircRNAs 的生物功能除了可以作为 miRNA 海绵体从而促进基因的转录, 它还能与蛋白质结合, 抑制蛋白活性、募集蛋白质复合体的组分或调控蛋白质的活性。Du 等发现 circRNA circ-foxo3 在肺癌细胞中高表达并且与细胞周期进程相关^[25]。沉默内源性 circ-foxo3 能够促进细胞增殖, 而异位高表达 circ-foxo3 则细胞周期进程受到抑制。circ-foxo3 能与细胞周期蛋白依赖性细胞周期蛋白激酶 2 (cyclin dependent kinase 2, CDK2) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 (p21) 结合, 从而形成 circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物。通常, CDK2 能与细胞周期蛋白 A 和细

胞周期蛋白 E 结合进而促进细胞周期进程, 而一旦 p21 激活则会抑制 CDK2 与周期蛋白的结合从而阻止细胞周期进程^[33], circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物的形成遏制了 CDK2 的功能, 从而阻断了细胞周期进程。另外, Du 等还发现内源性低水平的 circ-foxo3 能同时与 MDM2 (MDM2 proto-oncogene) 和 P53 二者结合从而增强 MDM2 与 P53 之间的相互作用, MDM2 能促进 P53 的泛素化以及随后的降解从而使 P53 处于低水平。而当过表达 circ-foxo3 能防止 MDM2 另一个目标蛋白 FOXO3 (MDM2 proto-oncogene) 不会被泛素化降解, 因为 circ-foxo3 能与 FOXO3 结合从而降低 FOXO3 和 MDM2 之间的作用。P53 水平的下降和 FOXO3 蛋白水平的上升能使 FOXO3 下游靶基因 Puma (BCL2 binding component 3) 含量的升高从而促进细胞凋亡^[34]。Yang 等人观察到 circMotl1 和 c-myc 共定位于细胞核, 两者之间的相互作用导致 c-myc 核易位并防止降解。CircMotl1 在乳腺癌中明显增加, 并通过与 c-myc 的相互作用而促进肿瘤的发生^[38]。

1.2.5 CircRNA 作为翻译的模板指导蛋白质的合成

尽管 circRNA 被定义为非编码 RNA 的一个亚类, 但越来越多的证据表明, 部分 circRNAs 具有翻译蛋白的潜力^{[36][41]}。现有的文献报道当 circRNA 出现以下特征时, 可以推定 circRNA 具有翻译蛋白的功能: (A) circRNA 具有足够长的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 这也是线性 mRNA 蛋白翻译所必需的条件; (B) 具有跨越反向剪切接头位点 (backsplicing junction) 的 ORF; (C) ORF 上游的翻译起始位置存在一些必要的调节元件, 如起始密码子附近的内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 以及在起始密码子附近甲基化修饰 (m6A)。circFBXW7 和 circSHPRH 就是环状 RNA 能翻译蛋白典型的例子, 它们对肿瘤的发生发展有着重要的意义。CircFBXW7 能编码一个 21-KDa 的蛋白, 命名为 FBXW-185aa。首先研究者构建了一个包含完整的或者截短的 circFBXW7 IRES 序列的双荧光素酶载体系统以测试 IRES 的活性, 结果表明, 只有长度完整的 circFBXW7 IRES 才具有高活性。然后, 将 circ-FBXW7 载体和其对照载体转染人细胞, 用特异性抗体和液相色谱串联质谱法检测 FBXW-185 aa, 结果表明, circ-FBXW 7 具有编码新蛋白的潜力。FBXW7-185aa 蛋白通过与 USP28 (ubiquitin specific peptidase 28) 竞争性结合而发挥抑癌作用, 阻止 USP28 (ubiquitin specific peptidase 28) 与 FBXW 7 α (F-box and WD repeat domain containing 7) 结合, 从而

抑制 USP28 诱导的 c-myc 稳定性。Circ-FBXW 7 和 FBXW 7-185 aa 在胶质母细胞瘤中表达下调,抑制细胞增殖和细胞周期加速^[39]。另外,由 SHPRH (SNF2 histone linker PHD RING helicase) 基因 26-29 外显子反向剪接形成的环状 RNA circ-SHPRH 也能编码 17KDa 的蛋白 SHPRH-146aa。SHPRH-146 aa 可保护全长 SHPRH 蛋白不受 DTL (denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog) 诱导的泛素化作用,而后者则以 E3 连接酶的形式参与增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的泛素化。在胶质母细胞瘤中, circ-SHPRH 和 SHPRH-146aa 均被下调,从而抑制细胞增殖和肿瘤发生^[40]。一个来源于长链非编码 RNA *LINC-PINT* (long intergenic non-protein coding RNA, p53 induced transcript) 的环状 RNA 也能编码一个长度为 87 个氨基酸的肽段,它能抑制胶质母细胞瘤癌基因转录延伸^[41]。

1.2.6 其他的功能机制

肿瘤相关染色体易位不仅编码致癌融合蛋白,而且还能产生融合的 circRNA。J Guarnerio 等人发现两种由染色体易位而产生的异常 fusion-circRNA: f-circM9 和 f-circPR。研究表明这两个 circRNA 与血液病的发生、发展有关, fusion-circRNA 的表达对细胞的生存和治疗具有重要意义^[42]。此外, Tan 等人在在融合基因 EML4-ALK 多变体 3b 发生易位的 H2228 细胞中发现了来源于 EML4-ALK 融合基因的内源性 F-circEA。F-circEA 不仅存在于非小细胞肺癌组织中,而且还存在于 EML-ALK 易位患者的血浆中^[43],这表明 F-circEA 可以作为潜在的分子检测标志。

1.3 circRNA 与肝脏疾病的研究进展

CircRNAs 是一种新的非编码 RNA 成员,能够在转录或转录后水平调控基因的表达。近年来的研究表明,一些 circRNAs 在肝癌 (Hepatocarcinoma, HCC) 中有不同程度的表达,并且其差异表达与临床病理和预后有密切关系, circRNA 可通过编码蛋白和靶向不同的 miRNAs 促进细胞的增殖、迁移、侵袭和转移从而在 HCC 的发展过程中发挥着重要作用。据报道, circMTO1 在肝癌组织中的表达水平显著下调并且其低表达与 HCC 患者预后不良有关。在体外和移植人肝癌组织的动物模型中,下调 circMTO1 的表达水平, miR-9 显著上调,其靶基因 *p21* 表达量降低从而导致细胞增殖和侵袭水平明显增加,细胞凋亡率降低^[44]。在肝癌组织和细胞中, *ZKSCAN1* 基因形成线性和环状两种 RNA,即线性的 *ZKSCAN1* mRNA 及

环状的 circZKSCAN1, 且这两种类型 RNA 的表达水平均明显低于正常组织和细胞。ZKSCAN1 的低水平表达仅与肿瘤大小呈负相关, 但 circZKSCAN1 的低水平表达与多种临床参数相关, 包括肿瘤数目、肝硬化、血管侵袭、显微血管侵袭以及肿瘤等级。在肝癌细胞中下调 circZKSCAN1 的表达水平能显著加强细胞增殖、迁移及侵袭能力。裸鼠体内的实验结果与细胞实验结果相似^[45]。来源于 SNF2 组蛋白连接 PHD RING 解旋酶基因 26-29 外显子的环状 RNA hsa_circ_0001649 在多种癌症中表达水平下调, 包括 HCC, 胃癌及胆管癌。研究表明, hsa_circ_0001649 的表达水平在肝癌组织中明显低于癌旁组织, 且其表达水平与肿瘤大小和肿瘤栓子的发生相关。生物信息学分析表明 hsa_circ_0001649 具有多种 RNA 结合蛋白的潜在结合位点, 包括 U2 辅助因子 65 kDa 亚基 (U2AF large subunit, U2AF65)、真核起始因子 4A-III (eukaryotic translation initiation factor 4A3, EIF4A3) 和无意义转录因子 1 (UPF1), 这意味着 hsa_circ_0001649 可能作为蛋白质海绵或转录调控子发挥作用^[46]。雄激素受体 (androgen receptor, AR) 通过与 ADAR1 (adenosine deaminase RNA specific) 启动子结合增强 ADAR1 的表达, ADAR1 能抑制 RNA 环化, 所以 AR 可通过上调 ADAR1 的表达来调节肝癌细胞的 circRNAs 的形成, 从而直接阻断肿瘤细胞中 circRNAs 的生物合成。来源于多腺苷酸结合蛋白 1 基因 (poly(A) binding protein cytoplasmic 1, PABPC1) 的 circARSP91 被 ADAR 1 显著下调, 值得注意的是, circARSP91 的异位表达可以抑制肝癌的增殖、生长和侵袭, 揭示 AR/ADAR1/circARSP91 调控网络对 HCC 的发生和其性别差异至关重要^[47]。cSMARCA5 在肝癌组织中表达水平较低, 这是核 RNA 解旋酶 DExH-Box Helicase 9 调控的结果。肝癌 cSMARCA5 的表达下调与肝癌的侵袭性特征密切相关, cSMARCA5 过表达可抑制肝癌细胞的增殖和迁移^[48]。与癌旁组织相比, Circ_0067934 在肝癌组织中有较高的表达, 并通过 miR-1324/FZD5/Wnt/ β -catenin 调控网络促进肝癌细胞的增殖和转移^[49]。Chen 等人发现 circHIPK3 促进肝癌细胞的增殖和迁移, 动物体内实验证明它能促进异种移植瘤的生长^[50]。Lin 等人发现了一种新的环状 RNA circCDK13 在肝癌发生过程中差异表达。与相应的癌旁肝组织相比, HCC 肿瘤组织中 circCDK13 的表达降低, circCDK13 过表达能明显抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力, 并且抑制细胞周期的进展^[51]。CircRNA_100338 的异位表达与 HCC 患者生存率降低、血管浸润增加和肺转移有关^[52]。CircC3P1 作为

一种肿瘤抑制因子, 不仅能抑制肝癌细胞的迁移和侵袭, 还能抑制肝癌细胞的增殖和淋巴转移^[53]。CircRNAs 具有高丰度和高稳定性等多种优势, 这表明 circRNAs 是 HCC 理想的生物诊断标记。然而, 与其他 ncRNAs (如 miRNAs 和 LncRNAs) 相比, circRNAs 在 HCC 中的研究仍处于起步阶段。迄今为止, 仅在 HCC 中发现并研究了少量的功能性 circRNAs。

2 HBV 乙肝病毒概述

HCC 是我国常见的恶性肿瘤之一, 全世界每年新发的肝癌患者大约有 25 万例, 死于肝癌的患者更是多达 50 万~60 万人^[54]。肝癌的发生发展涉及多个遗传学及分子生物学的改变, 酒精、滥用药物、炎症性肝病等众多因素均可导致肝癌的形成, 但乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染仍是目前导致肝癌形成的主要原因^[55]。HBV 是引起乙型肝炎 (简称乙肝) 的病原体, 它是嗜肝 DNA 病毒科的成员。电镜下乙肝病毒的颗粒结构主要有三种: 大球形颗粒 (直径约 42nm)、小球形颗粒 (直径约 22nm) 和管型颗粒。大颗粒是完整的病毒粒子, 又称 “Dane 颗粒”, 由包膜和壳衣壳组成。包膜中含有 HBsAg、糖蛋白和细胞脂肪。核心颗粒含有核心蛋白 (HBcAg)、环状双链 HBV-DNA 和 HBV-DNA 聚合酶, 是病毒的完整形式, 具有感染性。小的球形颗粒和管状颗粒都是由与病毒包膜相同的脂蛋白组成的, 前者主要由 HBsAg 形成的空心颗粒组成, 不含 DNA 和 DNA 聚合酶, 不具有传染性。后者是由小球形粒子串联聚合而成, 其组成与小球形粒子的组成相同^[56]。

HBV 具有传染性, 能引起机体免疫应答反应, 造成肝细胞或机体组织的病理损伤。HBV 相关肝癌发生、发展的研究结果显示, HBV 通过直接或者间接途径影响宿主肝细胞的信号转导和细胞周期的调控等进程。近年来, 利用转录组学、蛋白质组学、代谢组学、基因表达调控等技术手段对 HBV 相关肝癌的发生、发展等方面进行了深入的研究, 对 HBV 相关肝癌的发生、发展的分子机制有了一些新的认识^{[57]~[61]}。目前, 认为 HBV 主要通过以下几个方面参与 HCC 的发生: a) 病毒 DNA 与宿主染色体整合; b) 病毒整合以及病毒 HBx 蛋白活性引起的宿主基因组不稳定性增加; c) 激活端粒酶活性; d) HBx 和 HBc 蛋白引起的表观遗传修饰; e) 病毒蛋白 (野生型和突变型、包膜蛋白等) 的长时间表达对细胞死亡和增殖信号通路的调节^[62]。HBx 是 HBV 编码的一个重要蛋白, 它能够通过直接影响核内的转录

和（或）通过调节细胞质中的细胞信号通路而间接介导转录调控^{[63][64]}。HBx 能与 PRMT1（protein arginine methyltransferase 1）及 SETDB1（SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1）结合，从而解除它们对 HBV 转录的抑制作用促进病毒基因的表达^{[65][66]}。HBx 除了是病毒复制所必需的，还能与大量细胞靶点相互作用通过多种机制促进肝细胞转化（图 1.2）。HBx 结合的蛋白包括细胞增殖、细胞死亡、转录和 DNA 修复相关的蛋白。这些研究结果对于肝癌的发生有了一些系统的认识。之前，肝癌发病机制研究对象主要集中于编码蛋白的基因表达调控，近些年，发现非编码 RNA 虽不编码蛋白质，但其可在表观遗传水平、转录及转录后水平调控基因的表达从而参与肝癌形成的病理生理过程。因此，探索研究 HBV 相关新的非编码 RNA（ncRNA）的功能及其与 HBV 相关肝癌发生、发展的关系，对揭示肝癌发生、发展的分子机制、寻找新的分子治疗靶点、设计合理的治疗药物，进一步提高肝癌的治疗水平具有重要意义。

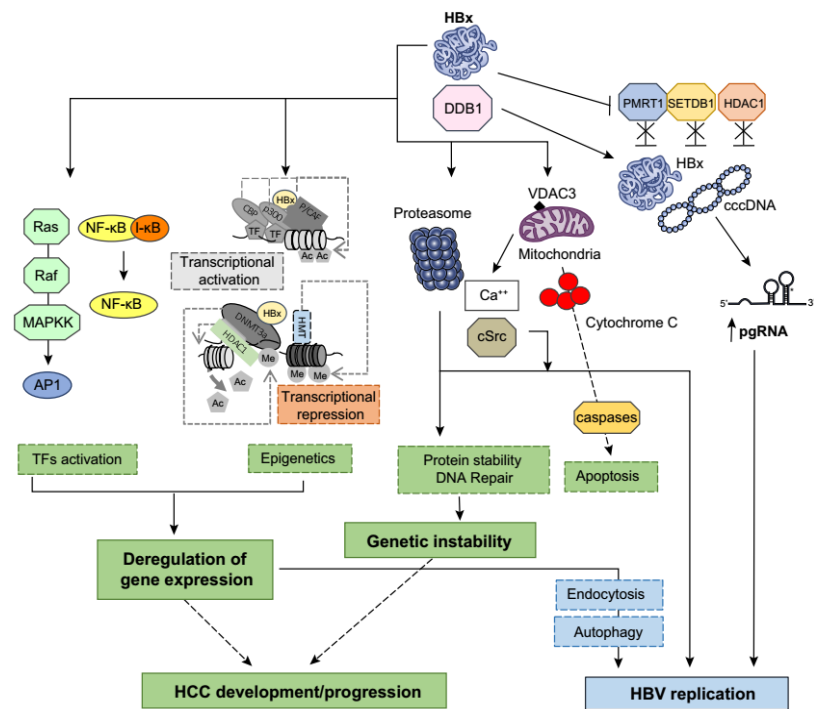


图 1.2 HBx 作用网络^[62]

Figure 1.2 The network of HBx^[62]

HBV 为 DNA 病毒，基因组是双链、松弛环状 DNA（Relaxation circular DNA，rcDNA），大小约 3.2 kb。在肝细胞核内，rcDNA 可能通过细胞的 DNA 复制机制

转化成游离形式的共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)。病毒利用 cccDNA 作为模板转录出 3.5 kb 前基因组 RNA (pre-genomic RNA, pgRNA), 以及 2.4 kb, 2.1 kb 和约 0.8 kb 的 mRNA, 其中 pgRNA 可逆转录出基因组 DNA 作为编码病毒核心蛋白和聚合酶蛋白的模板^{[67][68]}。HBV 所有的转录本都是由重叠的开放阅读框所编码, 具有相同的 3'端及多聚腺苷酸信号^[69]。虽然这些转录本起初被认为是翻译病毒蛋白的模板, 及通过逆转录复制合成病毒 DNA 的中间体, 但是最近研究显示这些被鉴定的 HBV RNA 转录本可能都具有重要的病理学功能^{[70][71]}。核苷(酸)类药物虽然能够显著抑制病毒反转录、病毒 DNA 的拷贝数、游离病毒 cccDNA、以及来源于 cccDNA 的转录本和蛋白质表达水平, 但是发现 HBV 蛋白或 RNA 水平与 HCC 发生的风险存在相关性^[72]。这些研究表明 HBV RNA 转录本不仅仅只是病毒蛋白合成和病毒 DNA 复制的模板, 可能还具有另外的功能参与疾病的过程^[70]

3 病毒非编码 RNA 研究进展

ncRNAs 具有调节细胞增殖、细胞周期、凋亡、转移和侵袭等重要生物学特性。ncRNA 功能性失调将会导致肿瘤等疾病的发生。HBx 能够通过调节多种 ncRNAs 的表达, 促进 HBV 相关肝细胞癌的发生。目前, miRNA 和长链非编码 RNA (long non-coding, lncRNA) 与肝癌发生、发展的相关性研究较为深入。在 HBV 相关性肝癌中, 大量的 miRNA 被鉴定出具有促进 HBV 相关的 HCC 细胞增殖 (let-7、miR-101、miR-132)、抑制其凋亡 (miR-21、miR-331-3p、miR-29c)、促进其迁移和侵袭 (miR-148a、miR-143、miR-29a) 以及细胞周期进程 (miR-148a、miR-221、miR-122) 等^{[60][61]}。在诸多 lncRNA 参与肝癌的发病过程研究中发现, Lnc-SchLAH 通过与 FUS 互作, 抑制了肝癌细胞的迁移。Lnc-UCA1 能够加速细胞周期进程, 促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[73]。lncRNA DBH-AS1 可以通过激活 ERK/p38/JNK MAPK 信号通路, 抵制细胞凋亡和增加细胞增殖^[74]。lncRNA HBx-LINE1 诱导肝细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路激活, 抑制 E 钙粘蛋白 (E-cadherin) 表达, 从而增加原发性肝细胞癌增殖、侵袭和迁移^[70]。lncRNA-Dreh 在 HBx 相关肝癌发生过程中作为一个肿瘤抑制因子, 能够结合并下调波形蛋白 (vimentin) 的表达, 改变了正常的细胞骨架结构, 从而抑制了细胞的迁移和侵袭^[75]。lncRNA HULC 与患者的

TNM 分期、肝内转移、复发及预后相关,能够通过上调 SPHK1 (sphingosine kinase 1) 的表达促进肿瘤血管生成^[76]。在肝癌细胞中过表达 lncRNA SPRY4-IT1 促进了肿瘤细胞的增殖和迁移^[77]。

与宿主不同,病毒的基因组大小十分有限。对于病毒来说,如何充分利用它们有限的基因组在宿主中生存增殖是一个问题。越来越多的研究表明病毒基因组除了能编码蛋白,还可以产生非编码 RNA,并且在调节细胞或病毒本身的基因表达谱方面发挥重要作用^[78]。近些年,关于病毒 ncRNA 参与疾病的过程的报道也越来越多。EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 编码的小非加尾 RNA (EBER) 直接影响鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 的发病^[79]。另外研究发现,EB 病毒编码的 EBER 能抵抗各种诱导细胞凋亡的刺激并有助于维护伯基特淋巴瘤 (Burkitt 淋巴瘤) 的恶性表型。在肠 407 细胞中转染 EBER 基因能明显保护细胞不受 Fas (Fas cell surface death receptor) 介导的吞噬作用^[80]。人类腺病毒 (Human adenovirus) 编码病毒相关 RNA (VAI and VAI), VAI 在感染细胞病毒复制期间具有抑制 RNAi 的作用,使 RNAi 沉默复合物不发挥作用^[81]。HBV 编码的 HBV-miR-3 通过结合 HBV 核心蛋白 (HBc) 的 mRNA,降低 HBc 蛋白表达,以及结合 HBV 前体基因组 pgRNA,从而抑制 HBV 的复制,这可能有助于解释 HBV 感染是如何导致肝细胞轻度损伤以及建立和维持随后的持续感染^[82]。Simian virus 40 (SV40) 病毒编码 miRNAs 去调控病毒基因的表达和降低细胞毒性 T 细胞的易感性^[83]。 γ -herpesvirus Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) 病毒同样能形成功能性 miRNAs。KSHV miR-K12-1 通过下调 p21 基因的表达水平从而促进病毒诱导的肿瘤形成^[84],此外, KSHV miR-K12-10a 还能抑制宿主的促炎反应^[85],除了能编码 miRNA, KSHV 还能编码 lncRNA。来源于 KSHV 病毒基因组的长链非编码聚腺苷化核 RNA (Polyadenylated nuclear RNA) 能在转录水平调控宿主和病毒基因的表达^[86]。黄病毒也能产生亚基因组的黄病毒 RNA。最新研究表明,病毒的基因组还能形成 circRNAs。Ungerleider 等人利用 RNase R-sequencing 方法在 I, II, III 三种潜伏类型的 EBV 感染细胞模型中鉴定出 EBV 能编码 circRNAs,这些 circRNAs 的表达主要取决于 EBV 的转录进程以及相关位点的转录水平,而且他们还具有细胞模型特异性^[87]。这些研究成果为进一步研究这类 EBV 编码的 circRNAs 在 EBV 相关疾病中的功能提供了必要的基础和资源。Toptan 等人也发现环状 DNA 肿瘤病

毒（EBV 和 KSHV）能编码环状 RNA，只含有 EBV 外显子的 circRNA 更多地分布在细胞质中，保留内含子的 circRNA 则出现在细胞核内，而来源与 KSHV 基因组的 circRNA 在细胞质和细胞核中都有分布^[88]。病毒 circRNAs 可以作为 RNA 生物学研究的重要模型系统，因为它们是从分子结构小而明确的操作子中表达的，而且病毒基因组的研究已十分深入，这些病毒 circRNAs 在病毒基因组背景下更容易被操纵。

目前已发现 HBV 可产生功能性 ncRNA，Sekiba 等人发现 HBV 的 pgRNA 能产生 circRNA^[69]，但 HBV 编码的 circRNA 有何生物学功能仍不清楚？本研究发现了 HBV 编码的一个新的 circRNA，旨在探讨该 circRNA 在 HBV 相关肝癌发生方面的作用及其可能的分子调控机制，这不仅可以从 HBV circRNA 这一新角度理解 HBV 参与 HBV 相关肝癌的发生、发展的分子机制，同时也可能为开发 HBV 相关肝癌的治疗药物提供新的靶标。

参考文献

- [1] Gould A R. Studies on encapsidated viroid-like RNA. II. Purification and characterization of a viroid-like RNA associated with velvet tobacco mottle virus (VTMoV). [J]. Virology, 1981, 108(1):123-133.
- [2] Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. [J]. Nature, 1986, 323(6088):558-560.
- [3] Salzman J, Gawad C, Wang P L, et al. Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2):e30733.
- [4] Chu-Yu Y, Li C, Chen L, et al. Widespread noncoding circular RNAs in plants. [J]. New Phytologist, 2015, 208(1):88.
- [5] Ye C Y, Zhang X, Chu Q, et al. Full-length sequence assembly reveals circular RNAs with diverse non-GT/AG splicing signals in rice[J]. RNA Biology, 2016, 14(8):00-00.
- [6] Wang Y, Mo Y, Gong Z, et al. Circular RNAs in human cancer[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1):25.
- [7] Westholm J , Miura P , Olson S , et al. Genome-wide Analysis of Drosophila Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and

- Age-Dependent Neural Accumulation[J]. Cell Reports, 2014, 9(5):1966-1980.
- [8] Gruner H , Cortés-López, Mariela, Cooper D A , et al. CircRNA accumulation in the aging mouse brain[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1):38907.
- [9] Shen Y , Guo X , Wang W . Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish[J]. FEBS Letters, 2016.
- [10]Zhang B , Han S , Feng B , et al. Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2017, 49(2): e293.
- [11]Wang M, Yu F, Li P. Circular RNAs: Characteristics, Function and Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(8).
- [12]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.
- [13]Granados-Riveron J T, Aquino-Jarquin G. The complexity of the translation ability of circRNAs[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2016, S1874939916301596.
- [14]Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs [J]. Molecular Cell, 2013, 51(6):792-806.
- [15]Chen L L , Yang L . Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biology, 2015, 12(4):381-388.
- [16]Meng X, Li X, Zhang P , et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world[J]. Briefings in Bioinformatics, 2017, 18:547–557.
- [17]Lyu D , Huang S . The emerging role and clinical implication of human exonic circular RNA[J]. RNA Biology, 2016, 14(8):1000-1006
- [18]Chen I , Chen C Y , Chuang T J . Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews, RNA, 2015, 6(5):563-579.
- [19]Conn S , Pillman K , Toubia J , et al. The RNA Binding Protein Quaking Regulates Formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160(6):1125-1134.
- [20]Li X , Liu C X , Xue W , et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection[J]. Molecular Cell, 2017, 67(2):214-227.
- [21]Errichelli L , Dini Modigliani S , Laneve P , et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons[J]. Nature Communications, 2017, 8:14741.
- [22]Kramer M C, Liang D, Tatomer D C, et al. Combinatorial control of Drosophila

- circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins[J]. *Genes & Development*, 2015, 29(20):2168.
- [23]Chen Y , Li C , Tan C , et al. Circular RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2016, 53(6) :359-365.
- [24]Bachmayr-Heyda A , Reiner A T , Auer K , et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation – exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:8057.
- [25]Du W W , Yang W , Liu E , et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(6): 2846-2858.
- [26]Li F , Zhang L , Li W , et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8):6001-6013.
- [27]Holdt L M, Stahringer A, Sass K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. *Nature Communications*, 2016, 7:12429.
- [28]Lu D, Xu A D. Mini Review: Circular RNAs as Potential Clinical Biomarkers for Disorders in the Central Nervous System[J]. *Frontiers in Genetics*, 2016, 7:53.
- [29]Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495 (7441) :384-388.
- [30]Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7:11215.
- [31]Ashwalfluss R, Meyer M, Pamudurti N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. [J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(1):55-66.
- [32]Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3):256.
- [33]Hinds P W , Mittnacht S , Dulic V , et al. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins[J]. *Cell*, 1992, 70(6):993-1006.
- [34]Du W W, Ling F, Yang W, et al. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2016, 24(2):357-370.

- [35] Yang Q , Du W W , Wu N , et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation[J]. Cell Death and Differentiation, 2017, 24(9):1609–1620.
- [36] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis[J]. Mol Cell. 2017;66(1):22–37.
- [37] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, et al. Translation of CircRNAs[J]. Mol cell. 2017, 66(1):9–21.
- [38] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)- methyladenosine[J]. Cell Res. 2017,27(5):626–41.
- [39] Yang Y, Gao X, Zhang M, et al. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis[J]. J Natl Cancer Inst. 2018,110(3):304–315.
- [40] Zhang M, Huang N, Yang X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. Oncogene[J]. 2018,37(13):1805–1814.
- [41] Zhang M , Zhao K , Xu X , et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 4475.
- [42] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from Cancer-associated chromosomal translocations[J]. Cell. 2016, 165(2):289–302.
- [43] Tan S, Gou Q, Pu W, et al. Circular RNA F-circEA produced from EML4-ALK fusion gene as a novel liquid biopsy biomarker for non-small cell lung cancer[J]. Cell Res. 2018, 28(6):693–697.
- [44] Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. Hepatology. 2017, 66: 1151–1164.
- [45] Yao Z, Luo J, Hu K, et al. ZKSCAN1 gene and its related circular RNA (circZKSCAN1) both inhibit hepatocellular carcinoma cell growth, migration, and invasion but through different signaling pathways[J]. Mol Oncol. 2017, 11: 422–437.
- [46] Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel

- biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark.* 2016, 16: 161–169.
- [47] Shi L , Yan P , Liang Y , et al. Circular RNA expression is suppressed by androgen receptor (AR)-regulated adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR1) in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death and Disease*, 2017, 8(11):e3171.
- [48] Yu J, Xu QG, Wang ZG, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol.* 2018, 68(6):1214–1227.
- [49] Zhu Q , Lu G , Luo Z , et al. CircRNA circ_0067934 promotes tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through regulation of miR-1324/FZD5/Wnt/ β -catenin axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(2): 626-632.
- [50] Chen G , Shi Y , Liu M , et al. circHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2):175.
- [51] Lin Q, Ling YB, Chen JW, et al. Circular RNA circckd13 suppresses cell proliferation, migration and invasion by modulating the jak/stat and pi3k/akt pathways in liver cancer[J]. *Int. J. Oncol.* 2018, 53: 246–256.
- [52] Huang X Y , Huang Z L , Xu Y H , 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]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):5428.
- [53] Zhong L , Wang Y , Cheng Y , et al. Circular RNA circC3P1 suppresses hepatocellular carcinoma growth and metastasis through miR-4641/PCK1 pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018,499(4):1044-1049.
- [54] Venook A P , Papandreou C , Furuse J , et al. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective[J]. *The Oncologist*, 2010, 15 Suppl 4(Supplement 4):5-13.
- [55] Elisabetta F. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries[J]. *World Journal of Hepatology*, 2012, 4(3):74-80.
- [56] Karayiannis P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread[J]. *Hepatology International*, 2017, 11(6):500-508.
- [57] Li S, Qian J, Yang Y, et al. GWAS Identifies Novel Susceptibility Loci on 6p21.32 and 21q21.3 for Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B Virus Carriers[J].

- PLoS Genetics, 2012, 8(7):e1002791.
- [58]Zhang H, Zhai Y, Hu Z, et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers[J]. Nat Genet, 2010, 42:755–758.
- [59]Amaddeo G, Cao Q, Ladeiro Y, et al. Integration of tumour and viral genomic characterisations in HBV-related hepatocellular carcinomas[J]. Gut, 2015, 64: 820–829.
- [60]Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49:1098–1112.
- [61]Zhang X, Liu S, Hu T, et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression[J]. Hepatology, 2009, 50:490–499.
- [62]Levrero M , Zucmanrossi J . Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma.[J]. Journal of Hepatology, 2016, 64(1):S84.
- [63]Belloni L , Pollicino T , De Nicola F , et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(47):19975-19979.
- [64]Lucifora J , Arzberger S , Durantel D , et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. Journal of Hepatology, 2011, 55(5):996-1003
- [65]Benhenda S , Ducroux A , Riviere L , et al. Methyltransferase PRMT1 Is a Binding Partner of HBx and a Negative Regulator of Hepatitis B Virus Transcription[J]. Journal of Virology, 2013, 87(8):4360-4371.;
- [66]Rivière L, Gerossier L, Ducroux A, et al. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase[J]. Journal of Hepatology, 2015, 63(5):1093-1102.
- [67]Ohno M , Otsuka M , Kishikawa T , et al. Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(23):7084-7088.
- [68]Ko C, Chakraborty A, Chou WM , et al. Hepatitis B virus (HBV) genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels[J]. Journal of Hepatology, 2018, 69(6):1231-1241.

- [69]Sekiba K , Otsuka M , Ohno M , et al. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(30):20953-20964.
- [70]Liang HW, Wang N, Wang YB, et al. Hepatitis B virus-human chimeric transcript HBx-LINE1 promotes hepatic injury via sequestering cellular microRNA-122[J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 64(2):278-291.
- [71]Duriez M , Mandouri Y , Lekbaby B , et al. Alternative splicing of Hepatitis B virus: a novel virus/host interaction altering liver immunity[J]. *J Hepatol*, 2017, 67: 687-699.
- [72]Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 4. 2018.
- [73]Wang F, Ying H Q, He B S, et al. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10):7899.
- [74]Huang J, Ren T, Cao S, et al. HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33791-33804.
- [75]Huang J, Guo Y, Zhao C, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx) -related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin[J]. *Hepatology*, 2013, 57(5):1882-1892.
- [76]Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes[J]. *Gastroenterology*.2013, 144:829–840.
- [77]Yu G , Lin J , Liu C , et al. Long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes development of hepatic cellular carcinoma by interacting with $ERR\alpha$ and predicts poor prognosis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):17176.
- [78]Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs[J]. *Virology*, 2011, 411:325–343.
- [79]Rosa MD, Gottlieb E, Lerner MR, et al. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII[J]. *Mol Cell Biol*, 1981, 1: 785–796.

- [80] Schwemmle M, Clemens M J, Hilse K, et al. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(21):10292-10296.
- [81] Inturi R, Kamel W, Akusjärvi G, et al. Complementation of the human adenovirus type 5 VA RNAI defect by the Vaccinia virus E3L protein and serotype-specific VA RNAs[J]. Virology, 2015, 485:25-35.
- [82] Yang X, Li H, Sun H, et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication[J]. J Virol. 2017 , 91(10): e01919- e01916.
- [83] Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells[J]. Nature, 2005 ,435(7042):682-686.
- [84] Gottwein E, Cullen B R. A human herpesvirus microRNA inhibits p21 expression and attenuates p21-mediated cell cycle arrest. [J]. Journal of Virology, 2010, 84(10):5229-5237.
- [85] Abend JR, Uldrick T, Ziegelbauer JM. Regulation of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor protein (TWEAKR) expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA prevents TWEAK-induced apoptosis and inflammatory cytokine expression[J]. J Virol ,2010, 84: 12139–12151.
- [86] Rossetto CC, Tarrant-Elorza M, et al. Regulation of viral and cellular gene expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus polyadenylated nuclear RNA[J]. J Virol, 2013, 87(10):5540-5553.
- [87] Ungerleider N, Concha M, Lin Z, et al. The Epstein Barr virus circRNAome[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(8): e1007206.
- [88] Toptan T, Abere B, Nalesnik MA, et al. Circular DNA tumor viruses make circular RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(37): E8737-E8745.

第二章 研究目的和内容

1. 研究目的意义

目前已有一些研究指出病毒可编码 circRNA, 但病毒来源的 circRNA 的功能及生物学意义目前无相关报道。以往有关 HBV 与肝癌发生、发展的研究主要集中在 HBV 编码的蛋白基因, 我们发现 HBV 编码的一个新的 circRNA, 其序列与 HBV 基因组上 489-2985 nt 区域完全匹配, 长度约 2.5 kb, 命名为 HBV_circ_1, HBV_circ_1 是否具有生物学功能? 是否参与 HCC 的发生、发展? 目前还不清楚。本研究通过对 HBV_circ_1 的生物学功能及其分子调节机制的研究, 不仅能从全新的角度解读 HBV 相关肝癌发生的机制, 也能为 HBV 相关肝癌的治疗提供新的分子靶点。

2. 研究内容

2.1 利用高通量测序技术从全转录组水平检测 HepG 2 细胞对 HBV 感染的应答

2.2 HBV 编码的 circRNA 筛选与鉴定

1) 根据全转录组测序, 结合生物信息学技术筛选 HBV 编码的 circRNA。

2) 对筛选获得的潜在 HBV circRNA (HBV_circ_1), 在肝癌细胞, 肝癌组织芯片及临床组织样本中通过反向 PCR, Sanger 测序分析, Northern blotting, 原位杂交等方法进行鉴定。

2.3 HBV_circ_1 的生物学功能及其分子机制探究

1) 检测 HBV_circ_1 对细胞表型的影响, 包括细胞增殖、凋亡、周期迁移等。

2) HBV_circ_1 相互作用的 miRNA 筛选鉴定

运用靶基因预测软件分析 HBV_circ_1 的靶 miRNA, 以及 miRNA 的靶基因 mRNA, 建立 HBV_circ_1-miRNA-mRNA 相互作用关系网络, 采用 RNA pull down, 双荧光素酶基因报告系统进一步确认。

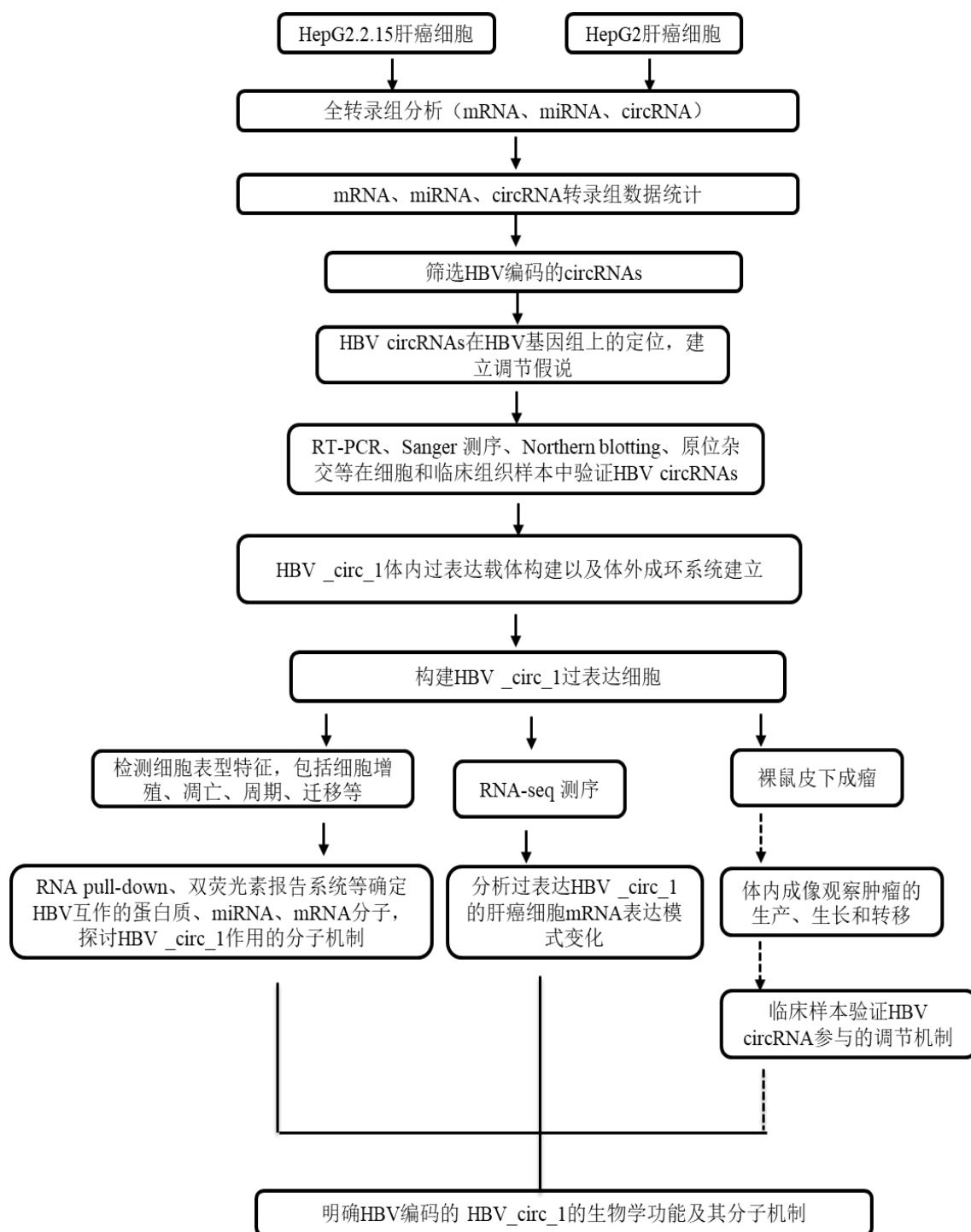
3) HBV_circ_1 与蛋白的互作: 采用 RNA pull down、质谱、RNA 免疫共沉淀

(RIP) 等技术手段鉴定与 HBV_circ_1 存在相互作用的蛋白。

4) 检测 HBV_circ_1 对 HBV 基因的调控作用

2.4 构建 HBV_circ_1 过表达肝癌细胞, 通过 RNA-seq 技术检测 HBV_circ_1 对肝癌细胞 mRNA 表达模式的影响。

3. 研究技术路线



注：虚线表示实验还在进展中

第三章 全转录组水平 HepG 2 细胞对 HBV 感染的应答

摘要:

为了理解全转录组 (mRNAs、miRNAs 和 circRNAs) 水平细胞对 HBV 的感染应答,进一步从全转录组水平探讨 HBV 感染在 HBV 相关 HCC 方面的作用及机制。本研究采用高通量测序技术,分析了 HepG2 细胞系 (n=2) 和 HBV 阳性的 HepG2.2.15 细胞系 (n=2) 的 RNA 表达模式。与 HepG2 细胞相比,10114 (6452) 个基因在 HepG2.2.15 细胞中上 (下) 调,37 (33) 个 miRNA 上 (下) 调。另外,在 HepG2 中 HepG2.2.15 分别发现 5672 和 13026 个 circRNA,其中 186 (65) 个 circRNA 在 HepG2.2.15 中上 (下) 调 ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$)。说明 HBV 感染导致细胞 mRNA、miRNA 和 circRNA 表达模式发生明显变化。用临床肝癌组织样本对体外肝癌细胞中的差异表达的 mRNA 和 circRNA 进行了验证,结果显示临床肝癌组织样本中 mRNA 的表达水平的变化与体外肝癌细胞系基本一致。另外,通过对 HBV 阳性细胞 HepG2.2.15 细胞系中差异表达的 mRNAs、miRNAs 和 circRNAs 的整合分析,构建了 HBV 阳性细胞内的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络,发现 circRNA circ_FIRRE 1 (chrX: 130870155~130928494) 分别与 NovelmiRNA-631 和 NovelmiRNA-969 相互作用,调控 86 和 22 条 mRNAs 的水平。circRNA circ_FIRRE 2 (chr 11: 22696396-22777499) 与 NovelmiRNA-323 相互作用调控 22 条 mRNAs 的水平。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, circRNA-miRNA-mRNA 调控网络中的靶基因主要富集在蛋白结合,肿瘤形成和抗病毒信号转导等途径中。HBV 感染改变了肝癌细胞中 RNA 的表达模式,为理解 HBV 相关性肝癌的发生、发展提供了新的线索。

关键词: HepG2 细胞系, HepG2.2.15 细胞系, 乙肝病毒 (HBV), circRNA-miRNA-mRNA 调控网络

1. 引言

近年来, circRNA 作为一种新型的非编码 RNA 成为了研究热点,它具有结构

稳定、细胞类型和组织特异性强等特点^[1]。与线性 RNA 相比, circRNA 没有游离的 3'和 5'端,故而能够使抵抗 RNA 外切酶^[2]。此外,还发现 circRNA 与 lncRNA 一样,能作为 miRNA 海绵体调控 miRNA 的活性^{[3][5]}。CircRNAs 在诸多人类疾病中发挥着重要作用,如阿尔茨海默症^[6]、肺纤维化^[7]、人乳腺癌^[8]、肺癌和其他癌症^{[9][10]}。另外,已有相关研究报道外来病原体的入侵会改变宿主的 circRNAs 的表达模式。如在猿猴病毒(Simian virus 40, SV40)感染后,猴肾源性 Vero 细胞中共发现 134 个 circRNAs 明显差异表达,其中有 103 个上调,31 个下调。基因功能注释及 KEGG 通路分析发现 SV40 感染可能会通过改变差异表达的 circRNAs 的亲本基因来影响各种癌症相关通路及细胞免疫通路,包括 p53 通路, toll 样受体通路, Janus 激酶-信号传导通路^[11]。结核分枝杆菌感染后,肺结核病人血样中的 RNAs (mRNAs、miRNAs 和 circRNAs) 表达模式发生了显著变化,与正常人相比,其中有 170 个 circRNAs 差异表达。Hu 等人对差异表达的 mRNAs、miRNAs 和 circRNAs 的整合分析,构建了核分枝杆菌感染后病人体内的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络^[12]。乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球主要的健康问题,HBV 可以刺激宿主的免疫反应,导致肝脏细胞或身体组织的病理损伤。然而,从全转录组水平(mRNAs、miRNAs 和 circRNAs)探讨肝癌细胞对 HBV 感染应答的报道非常有限。本研究采用全转录组测序和小 RNA 测序的方法,比较 HepG 2 细胞系和 HBV 阳性的 Hepg2.2.15 细胞系 circRNAs、miRNAs 和 mRNAs 的表达谱,通过整合分析构建了 circRNA-miRNA-mRNA 调节网络,发现 HBV 感染改变了肝癌细胞中 RNAs 的转录水平,差异表达的 circRNAs 可能通过与 miRNAs 互作调节 HBV 相关 HCC 的发生和发展。研究结果为进一步了解 HBV 相关性肝癌的发病机制提供新的线索。

2. 材料与方法

2.1 生物材料

HepG 2 细胞系由苏州大学基础医学与生物科学学院高玉振教授馈赠, HBV 阳性细胞系 HepG2.2.15 购自上海 MITO-BIO 公司。细胞用含有 10%血清的 DEME-High (HyClone, 美国)培养基在 5% CO₂、37°C 条件下培养。HBV 阳性肝癌组织和 HBV 阴性肝癌组织采集于江苏省苏州市苏州大学第一附属医院。

2.2 实验试剂

RNAiso Plus 试剂购自 TaKaRa 公司。反转录试剂盒及 real-time PCR 检测试剂盒均购自北京全式金公司。

2.3 总 RNA 提取

总 RNA 提取, 采用 mirVana™ miRNA ISolation Kit (Ambion-1561) 试剂盒, 方法参照说明书。

2.4 全转录组测序

HepG 2 细胞 (n=2) 和 HepG2.2.15 细胞 (n=2) 进行全转录组测序。全转录组测序使用 Hiseq4000 平台, 在质控后的总 RNA 中去除 rRNA, 构建特异性文库, 进行测序。测序深度为 10Gb 每样, 全转录组测序由苏州金唯智生物医学科技有限公司完成, 测序的原始数据已上传到了 NCBI 数据库, 转录组原始数据登录号为: SRR7812047, SRR7812048, SRR7812046, SRR7812044。小 RNA 原始数据登录号为: SRR7892716, SRR7892716, SRR7892713, SRR7892717。

2.5 测序数据的评估

通过 paired-end 测序获得了大量的样本数据。为了排除数据错误率对结果的影响, 对原始数据进行质量预处理, 并对整个质控过程中的 reads 数进行统计汇总。

质量预处理步骤:

- 1) 过滤掉低质量的 reads, 质量阈值 20, 长度阈值 35bp。
- 2) 从 3'端去除低质量碱基: 质量阈值 20。
- 3) 切除 reads 中含 N 部分序列: 长度阈值 35bp。

2.6 Clean reads 基因组比对分析

使用 HISAT2.0.1 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/faq.shtml>) 软件对获得的 reads 进行 mapping, 分析所获得的转录本。

2.7 mRNA 测序数据处理分析

2.7.1 mRNA 表达水平分析

mRNA 的转录水平的计算使用 FPKM(每百万 fragments 中来自某一转录本每千碱基长度的 fragments 数目) 法。FPKM 不仅考虑了测序深度对 fragments 计数的

影响,也考虑了转录本长度对 fragments 计数的影响,是目前最常用的估算转录本表达水平的方法。FPKM 计算公式如下:

$$FPKM(A) = \frac{\text{比对到基因}A\text{的}fragments\text{数}}{\text{比对到所有基因的总}fragments\text{数} \times \text{基因}A\text{的长度}} \times 10^9$$

FPKM 法计算得到的转录本表达量可直接用于比较不同样品间的转录本表达差异。

2.7.2 差异表达 mRNA 的筛选

用 DESeq 软件(<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq.html>)对各个样本 mRNA 的 counts 数目进行标准化处理(采用 basemean 值来估算表达量),计算差异倍数,并采用 NB(负二项分布检验的方式)对 reads 数进行差异显著性检验,最终根据差异倍数及差异显著性检验结果来筛选差异基因。

根据 RNA-seq 数据比较分析两个样品中 mRNA 的差异表达水平时,采用以下二个标准:一是 FoldChange,两样品中同一个 mRNA 表达水平的变化倍数;二是 p-value 或 FDR(adjusted p value),对每个 mRNA 进行 p-value 的计算得到 FDR 值,再用 FDR 误差控制法对 p-value 作多重假设检验校正。默认筛选差异的条件为 $P < 0.05$ 且 $\text{FoldChange} > 2$ 。

2.7.3 差异表达 mRNA 的 GO 和 KEGG 富集分析

为了注解差异表达 mRNA 的生物学功能,提示 HBV 感染后细胞水平上的生物学差异,我们对差异表达 mRNA 进行 GO (Gene ontology) 富集分析,对其功能进行描述。统计每个 GO 条目中所包含的差异 mRNA 个数,并通过超几何分布检验方法计算每个 GO 条目中差异 mRNA 富集的显著性,最后计算得到一个富集显著性的 P 值, P 值越小表示差异 mRNA 在该 GO 条目中富集越显著,其计算公式为:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

Enrichment score 计算公式为:

$$Enrichment\ score = \frac{\frac{m}{n}}{\frac{M}{N}}$$

其中, N 为所有 mRNA 中具有 GO 注释的 mRNA 数目; n 为 N 中差异表达 mRNA 中具有 GO 注释的 mRNA 数目; M 为所有 mRNA 中注释为某特定 GO term 的 mRNA 数目; m 为注释为某特定 GO term 的差异表达 mRNA 数目。可以根据 GO 分析的结果, 结合生物学意义从而为挑选后续研究的 mRNA 提供线索。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是有关 Pathway 的主要公共数据库, 利用 KEGG 数据库对差异 mRNA 进行 Pathway 分析(结合 KEGG 注释结果), 并通过超几何分布检验方法计算每个 Pathway 条目中差异 mRNA 富集的显著性, 最后计算得到一个富集显著性的 P 值, P 值越小表示差异 mRNA 在该 Pathway 条目中富集越显著, 其计算公式为参见 GO 富集分析。通过对差异 mRNA 的 Pathway 富集分析, 可以寻找不同样品的差异 mRNA 可能和哪些细胞通路的改变有关。本研究中默认的 P 值设置为 <0.05 , 挑选前 30 的差异基因进行分析。

2.8 小 RNA 测序数据处理分析

2.8.1 序列比对注释

Small RNA 种类繁多, 包括 miRNA、tRNA (tiRNA、tRFs)、rRNA、piRNA、snoRNA 等。为了对测序结果中的小 RNA 进行分类注释, 将 clean reads 与 Rfam 数据库 (<http://rfam.xfam.org>)、cDNA 序列 (<http://www.ncgr.ac.cn/grasscarp>)、物种重复序列库 (<http://www.repeatmasker.org>)、miRBase 数据库 (www.mirbase.org) 进行对比注释。

2.8.2 新的 miRNAs 预测

将 small RNA (sRNA) 测序数据和不同数据库比对, 尽可能去除 tRNA、snRNA、rRNA 等 sRNAs, 随后将过滤后的序列和 miRBase 数据库比对, 进行已知 miRNA 的统计。对未注释上的序列进行新的 miRNA 预测, 即 novel miRNA Prediction。Novel miRNA 的鉴定使用 Mirdeep2 软件 (<https://github.com/rajewsky-lab/mirdeep2>)。该软件的分析方法为, 将没有比对上已知 miRNA 的序列同基因组序列进行比对, 前提为序列长度至少达到 18 bp, 并能够 mapping 上基因组。采用 RNAfold 软件

(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), 对能够 mapping 上基因组的序列进行二级结构预测, 把能够形成 miRNA 发夹的前体序列认为可能是新的 miRNA 序列。提取出预测出的 miRNAs 的成熟序列以及 star strand 序列, 同时进行 novel miRNAs 的定量分析。

2.8.3 miRNAs 表达水平聚类分析

聚类分析是对数据进行相似度计算, 并根据相似度将数据进行分类, 从而将具有相同功能或密切联系的 miRNA 聚集成类, 识别未知 miRNA 的功能或已知 miRNA 的未知功能, 推断是否共同参与同一代谢过程或细胞通路。以不同实验条件下的差异 miRNA 的 TPM (Transcripts per million, $\text{TPM} = \text{miRNA reads 数} \times 10^6 / \text{total reads}$) 值为表达水平, 进行层次聚类(hierarchical clustering)分析。

2.8.4 miRNAs 靶基因预测

研究 miRNA 生物学功能和作用机制的关键是准确识别 miRNA 的靶基因。miRNA 通过结合 RISC, 并作用于靶基因的 3'UTR 区域, 从而降解靶基因或抑制靶基因的翻译。当前预测 miRNA 靶基因的算法通常遵循以下几个原则: 1. miRNA 的“种子区”与靶基因的 3'UTR 区碱基互补配对; 2. 靶点在多物种间的序列是保守的; 3. miRNA 与靶基因形成双链结构的热力学稳定性; 4. 靶基因二级结构和靶点外的序列对靶基因预测的影响。基于以上原则采用 miranda (<http://miranda.org.uk/>) 软件, 对 miRNA 序列以及对应物种的基因组 cDNA 序列进行可能的靶位点预测。

差异 miRNA 的靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析方法参照方法 2.7.3。

2.9 circRNA 测序数据处理分析

2.9.1 circRNA 预测

通过高通量测序技术预测 circRNA 最关键的原理是寻找反向剪接的序列, 将测序得到的 clean reads 与人类基因组序列比对, 基于比对结果利用 CIRI 2.0 (<https://sourceforge.net/projects/ciri/>) 软件预测形成 circRNA 的前后位置信息。

2.9.2 circRNA 表达量分析

目前, 对于绝大多数的 circRNA 而言都难以获得其完整的序列, 因此通常用 circRNA 的 back-splicing 位点处的 junction reads 来计算其表达量, 采用 SRPBM(spliced reads per billion mapping)对 reads 进行归一化处理, 统计不同表达水平下 circRNA 的数量以及单个 circRNA 的表达水平。SRPBM = circular reads 数/

比对 reads 数 (units in billion) /read 长度。按照差异显著性标准 (差异 circRNA 表达变化 2 倍以上且 $FDR \leq 0.05$) 进行筛选, 统计 circRNA 显著性差异表达上下调情况。

差异 circRNA 来源基因的 GO 和 KEGG 富集分析方法参照方法 2.7.3。

2.9.3 circRNA 与 miRNA 相互作用预测

环状 RNA 一个重要功能是在不同物种中起到 miRNA 海绵的作用, 称之为竞争性内源 RNA (ceRNA), 能竞争性结合 miRNA, 从而调控靶基因的表达。从 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 数据库下载已知的人类 miRNA 成熟序列, 采用软件 miranda 预测 circRNA 与 miRNA 的互位点。

2.10 Real-time PCR

为验证全转录组测序结果, 用 TRizol reagent 按照说明书的步骤从 1×10^6 HepG 2 和 HepG2.2.15 细胞或 0.05g 肝癌组织中提取总 RNA。Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度, 取 2 μ g 总 RNA, 参照全式金的 First Strand cDNA Synthesis 反转录试剂盒说明书合成 cDNA。随机选取 7 个差异表达的 mRNA 用设计的定量引物检测其表达水平 (表 3.1)。检测差异表达的 circRNA 时, 总 RNA 需要经过 RNase R 酶消化。按 1U RNase R 酶消化 1 μ g RNA 加样, 以消除线性 RNA 的干扰, 然后取 2 μ g RNA 用随机引物反转录合成 cDNA, 用表 3.1 中的 circRNA 定量引物检测随机选取的 5 个差异表达的 circRNA。以人 β -actin 基因作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 RNA 的表达水平。Real-time PCR 反应体系为: 2 $\times$ TransStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L (1 μ mol), cDNA 模板 0.1 μ L, 加水至 20 μ L。Real-time PCR 程序设置如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 随后 39 个循环: 95 $^{\circ}$ C 10sec, 60 $^{\circ}$ C 1 min。每个样品重复 3 次。

表 3.1 Real-time PCR 所用引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
Circ_CREBBP	CTGGCTGAGACCCTAACGCA	ATTCTCCTCCATTGGGTATC
Circ_PDE8A	ACGGTCTAGGGCTTCTGTCA	CTGCCCTGAGTTGTCTCTGTG
Circ_RAB3IP	CCTGTCCATTGTGGGCTCAT	GCTGTTCTGGAGGCTGTGGA
Circ_RNF220	AGGGAGGCCAACCAGCACTT	GGTTGATGACACTGGGAAGA
chr14:40124049-40125012	CCCATTTAGGAGAACATCCA	AGCTTTCTGATGGGTTTACA

β -actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC
myc	GGAGGCTATTCTGCCCATT	CGTAAGTCCTGTGAGATGGG
exosc4	CGTAAGTCCTGTGAGATGGG	GTCCCACCATCTGCCTGTAG
zscan22	GCCAAACCTCACCTCCCAAG	AACATCTTCCTACACTCGCG
znf775	GGTGGTCGTCCCTGAAGATC	GGTGCTGCTTCTGGCTGAAG
gbx2	TTACAGCCACACCAGAAGAC	CGCAGATTACAGCAGAGGTT
hoxd1	GTTTGGGATGGAGGTGGGAG	GGCAAAGATAGCAGCGGAGC
neu4	CAGGAGCACAGATACAGAGC	TGCACACTCTCCTCTGGGCT

2.11 数据分析

使用 GrapPad Prism 6 软件对数据进行统计分析。数据表示为“标准差”。两组之间的 RNA-SEQ 和 QRT-PCR 数据的变量通过标准的 t 检验进行比较。在 RNA-SEQ 结果中，选择表达变化倍数 ≥ 2 的 CircRNA/mRNA 进行进一步分析， $P < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。

3. 结果与分析

3.1 HBV 感染后肝癌细胞 RNAs 表达模式概述

通过全转录组测序，在 HepG 2 和 HepG 2.2.15 细胞系中共检测到了 269,814 条 mRNAs, 19,422 条 circRNAs 和 2,487 条 miRNAs。mRNAs 的 RPM 表达盒、circRNAs 的 SRPBM 表达盒如图 3.1A、图 3.2B 所示。将所有预测的 circRNAs 与已知的 circRNAs 数据库 circBase (<http://www.circbase.org/>) 进行比对，发现 17,929 个 circRNAs 已被注释，1,493 个是未知的 circRNAs。通过与数据库 Rfam (<http://rfam.xfam.org/>) 比对，发现 804 个 miRNAs 已被注释，还有 1,683 个 miRNAs 是通过软件 miRDep 2 预测的（表 3.2）。另外，在 HepG 2.2.15 细胞系中检测到的 circRNAs 总数(13026)多于 HepG 2 细胞系检测到的总数（5672）（图 3.1 C）。除了 circRNAs 总数不同外，circRNAs 各类型的占比也不同，其中，来源于外显子的 circRNAs，HepG 2.2.15 细胞系比 HepG 2 细胞系多，而来源于内含子的 circRNAs 和来源于基因间区域的 circRNAs 则比 HepG 2 细胞系少(图 3.1 D)。

表 3.2 RNA 测序数据的统计

RNAs	HepG2 Cell Line	HepG2.2.15 Cell Line
------	-----------------	----------------------

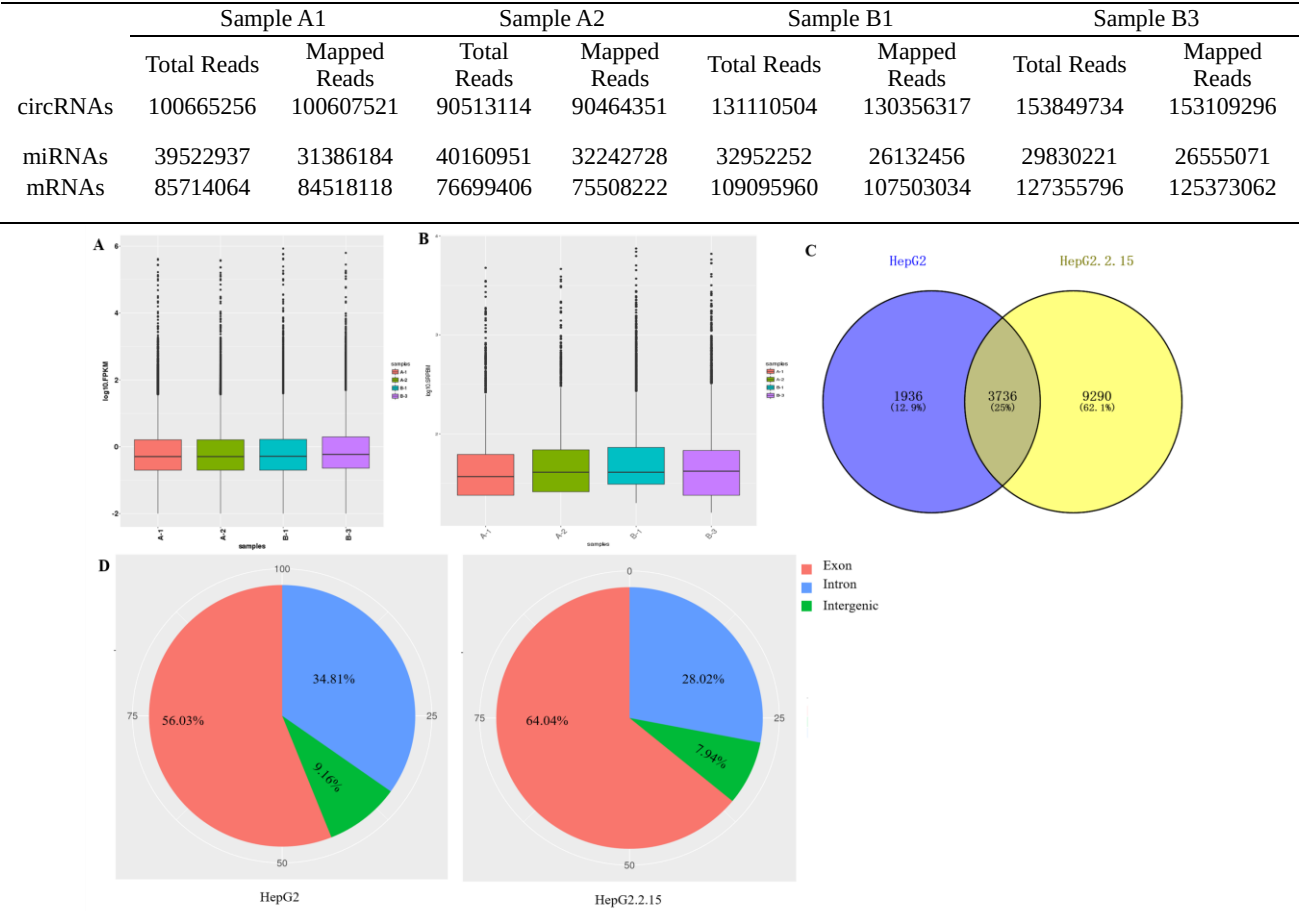


图 3.1 RNA 总体表达模式

A, 4 组样本中 mRNAs 的 RPM 表达盒, A1 和 A2 代表 HepG 2 细胞系, B1 和 B3 代表 HepG 2.2.15 细胞系。B, 4 组样本中 circRNAs 的 SRPBM 表达盒。C, HepG 2 细胞和 HepG 2.2.15 细胞中鉴定的 circRNA 数。D, HepG 2 细胞和 HepG 2.2.15 细胞中 circRNA 的分类。

Figure 3.1 Overview of RNAs profile.

A, Box plots of RPM value of mRNAs in four samples. A1 and A2 represent HepG 2 cell line, and B1 and B3 represent HepG 2.2.15 cell line. B, Box plots of SRPBM value of circRNAs in four samples. C, circRNAs identified from HepG2 and HepG 2.2.15 cell lines. D, The types of circRNAs in HepG 2 and HepG 2.2.15 cell lines. The circRNAs were classified into 3 types (exon-, intron- and intergenic- circRNAs) according to its sequence composition.

3.2 差异表达基因主要参与 RNA 降解、细胞周期和 p53 信号通路

根据 FPKM 值评估 mRNA 在 2 种细胞中的表达差异,发现同一细胞系不同样本间基因表达模式相似, HepG 2 和 HepG2.2.15 细胞之间的 mRNA 表达模式存在显著差异 (图 3.2 A, B)。两组细胞系间差异表达 mRNAs 有 16,566 个 (变化倍数 ≥ 2.0 , $P < 0.05$), 其中 10,114 个表达上调, 6,452 个表达下调(图 3. 2C)。为验证转录组测序结果,随机选取了 7 种 mRNAs(myc, exosc4, zscan22, znf775, gbx2, hoxd1, neu4)通过 real-time PCR 对其表达水平进行验证。Real-time PCR 结果与细胞全转录组测序结果的总体趋势一致,表明测序结果准确、可信 (图 3.2 D)。同时,也检测了 HBV 阳性和 HBV 阴性肝癌组织中 7 种 mRNAs 的表达水平,结果表明,5 种 mRNAs 的变化趋势与 HBV 阳性细胞的变化趋势一致(图 3.2 D),说明 mRNA 在体内的表达模式变化与体外细胞内的结果基本一致。

为了进一步理解 HBV 感染 HCC 发生发展的影响,对差异表达的 mRNAs 进行了 GO 富集分析,结果显示:差异表达的基因主要富集在细胞进程 (cellular processes),生物调节 (biological regulation),单个生物和生物进程 (single organism and processes),催化活性 (catalytic activity),结合活性 (binding activity),细胞器组分 (Organelle part),细胞组分 (cell part)和细胞器 (organelle)等亚类(图 3.2 E)。KEGG 通路富集分析显示,差异表达的基因主要参与 RNA 降解 (RNA degradation),细胞周期 (cell cycle), p53 信号通路 (p53 signaling pathway (图 3.2 F)。

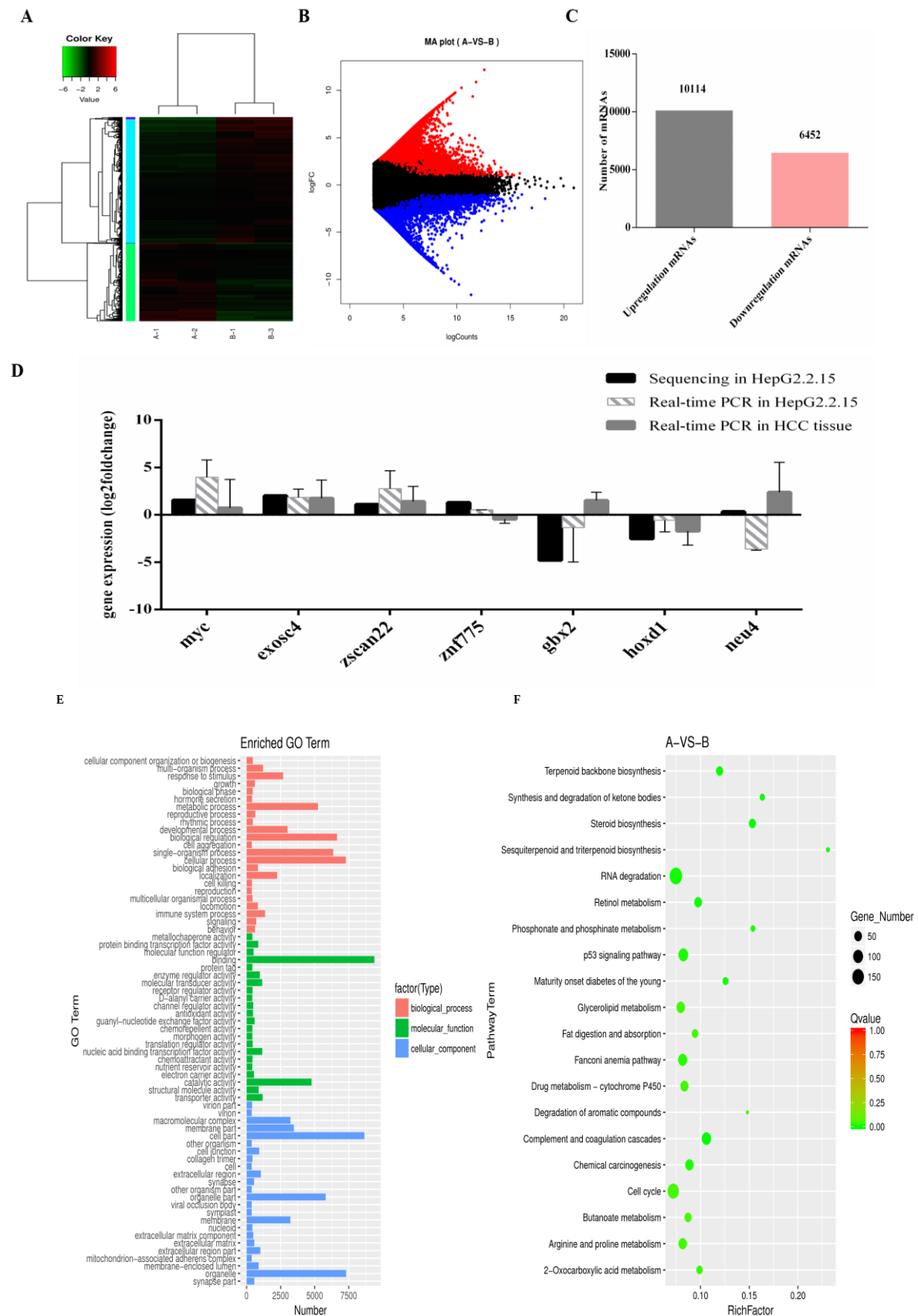


图 3.2 差异表达的基因主要参与 RNA 降解, 细胞周期以及 p53 等信号通路

A, 聚类分析热图表示 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞间差异表达的基因, 红色代表高表达的基因, 绿色代表低表达的基因。B, 火山图显示基因的数量和分布。C, 在 HepG2.2.15 细胞中上调和下调的基因 RNA 个数。D, 通过 real-time PCR 在 HepG2、HepG2.2.15 细胞、HBV 阳性和 HBV 阴性的肝癌组织中验证差异表达的基因 RNA 的表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达水平。E, 差异表达的基因的 GO 富集分析。y 轴表示 GO 条目, x 轴表示在该 GO 条目中富集的基因个数。F, KEGG 富集分析的前 30 条通路。x 轴表示富集因子, y 轴表示通路名称。点的大小代表在一个通路中富集的基因数量, 而点的颜色代表 Qvalue 范围。

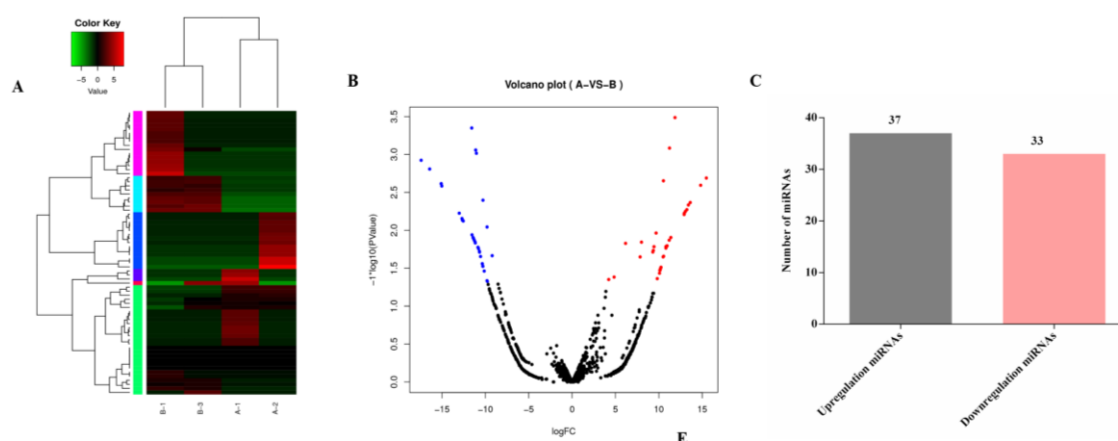
Figure 3.2 Differently expressed genes between HepG2 and HepG2.2.15 cell involved RNA degradation, the cell cycle, and the p53 signaling pathway.

A, The clustered heat map showing differentially expressed mRNAs from HepG2 cell line compared with HepG2.2.15 cell line. Red indicates high expression circRNAs, green indicates Low expression of circRNA. B, Volcano plot shows the number and distribution of mRNAs in the same plane. C, The number of upregulated and downregulated mRNAs (fold change ≥ 2 , $P\leq 0.05$) in HepG2.2.15 cell line. D, Validation of mRNAs expression with real-time PCR. Validation of mRNAs expression with real-time PCR in HepG2, HepG2.2.15 cell lines, i HBV-positive and HBV-negative liver cancer tissue. The expression of mRNAs was analyzed from the whole transcriptome sequencing with real-time PCR. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to normalize the relative gene expression data. E, GO enrichment analysis of dysregulated mRNAs. The y-axis shows the GO term, and the x-axis shows the number of dysregulated mRNAs in the term. F, The 20 most enriched KEGG pathways based on dysregulated mRNAs. The x-axis shows the enrichment score, and the y-axis shows the rich factor. The point size represents the number of genes enriched in a pathway, and point color represents Qvalue range.

3.3 差异表达 miRNAs 的靶基因主要富集于与癌症相关的信号通路中。

比较 miRNA 转录组学结果显示, HepG 2 和 HepG 2.2.15 细胞的 miRNA 表达

模式有显著性差异(图 3.3A, B)。在 HepG2.2.15 细胞中共检测到 70 个差异表达的 miRNAs (变化倍数 ≥ 2.0 和 $P < 0.05$), 其中 37 个表达上调, 33 个表达下调(图 3.3C)。为了进一步确定 HepG 2 细胞中 miRNA 表达对 HBV 感染的应答, 对差异表达的 miRNAs 的靶基因进行了 GO 和 KEGG 分析。筛选 P 值 <0.05 的 GO 条目, 按 P 值对其进行排序。结果发现, 靶基因主要富集在单一生物进程 (single organism processes), 发育进程 (development processes), 细胞进程 (cellular processes), 生物调控 (biological regulation), 应激反应 (response to stimuli), 生物进程中的代谢过程 (metabolic processes in the biological processes), 催化活性 (Catalytic activity), 结合活性 (binding), 转运体活性 (transporter activity), 细胞组分 (Cell part) 和大分子复合物 (macromolecular complex) 等亚类 (图 3.3 D)。此外, KEGG 通路分析显示, 差异表达的 miRNAs 的靶基因主要参与癌症相关的信号通路, 如肿瘤的转录调控失调 (transcriptional misregulation in cancer), p53 信号通路 (p53 signaling pathway), 癌症的蛋白多糖通路 (proteoglycans in cancer), Ras 信号通路 (Ras signaling pathway), PI3K-Akt 信号通 (PI3K-Akt signaling pathway), Hippo 信号通路 (Hippo signaling pathway) 和胞外信号调节激酶(MAPK)信号通路 (the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway)。 (图 3.3 E)。



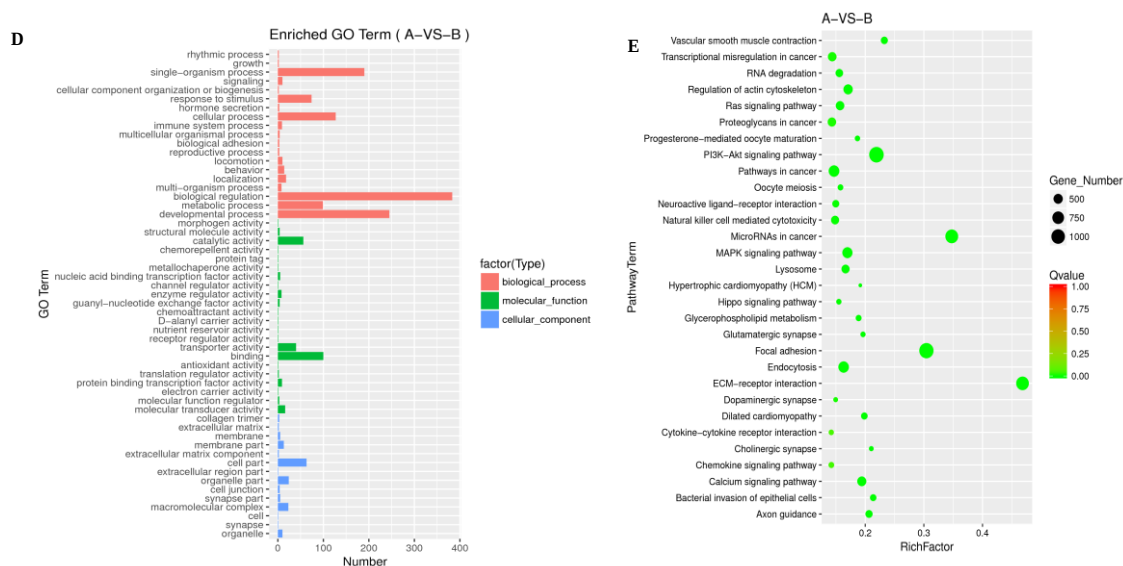


图 3.3 差异表达的 miRNA 靶基因主要参与肿瘤相关的信号通路

A, 聚类分析热图表示 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞间差异表达的 miRNA, 红色代表高表达的 miRNA, 绿色代表低表达的 miRNA。 **B**, 火山图显示 miRNA 的数量和分布。 **C**, 在 HepG2.2.15 细胞中上调和下调的 miRNA 个数。 **D**, 差异表达的基因的 GO 富集分析。 y 轴表示 GO 条目, x 轴表示在该 GO 条目中富集的基因个数。 **E**, KEGG 富集分析的前 30 条通路。 x 轴表示富集因子, y 轴表示通路名称。点的大小代表在一个通路中富集的基因数量, 而点的颜色代表 Qvalue 范围。

Figure 3. 3 Target genes of differentially expressed miRNAs involved carcinogenesis related signaling pathways.

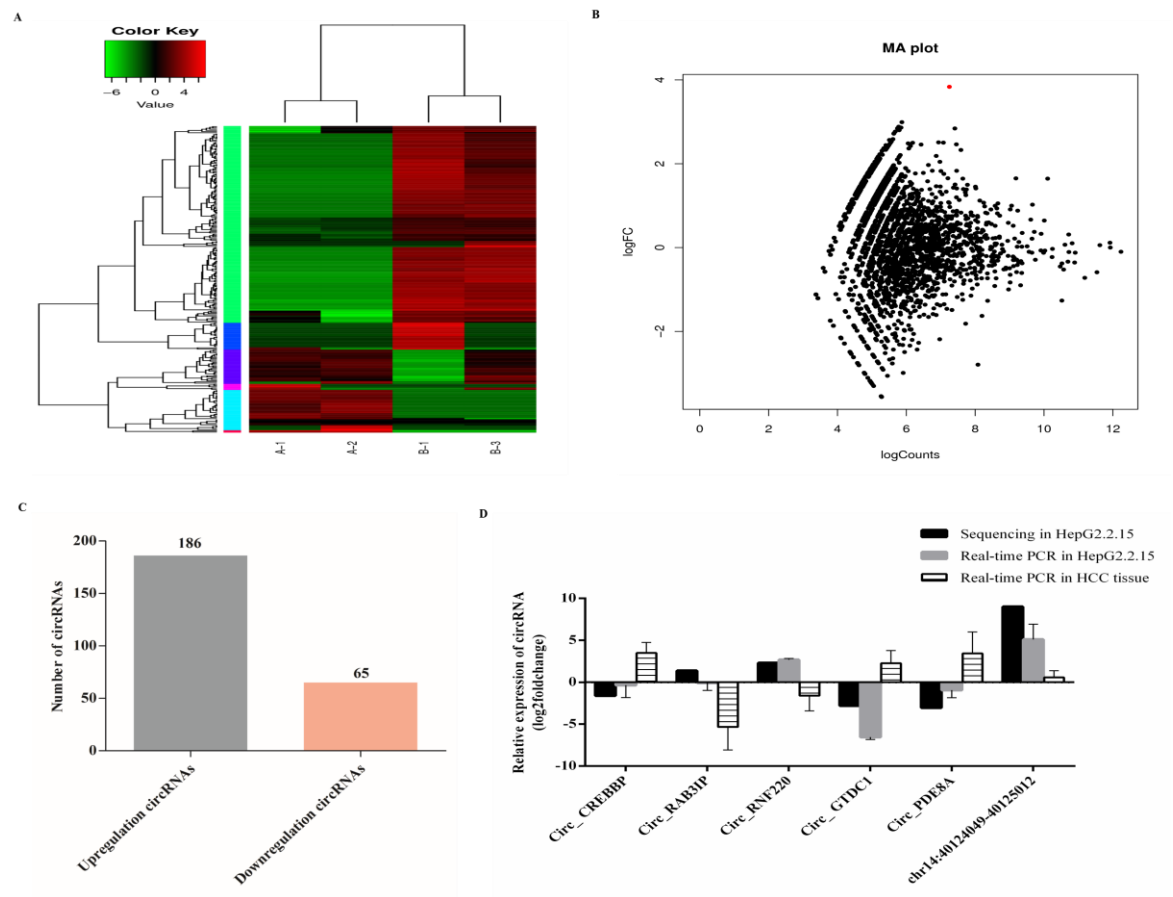
A, The clustered heat map showing differentially expressed miRNAs from HepG2 cell line compared with HepG2.2.15 cell line. Red indicates high expression circRNAs, green indicates Low expression of circRNA. **B**, Volcano plot shows the number and distribution of miRNAs in the same plane. **C**, The number of upregulated and downregulated miRNAs in HepG2.2.15 cell line. **D**, GO function enrichment of dysregulated miRNA target genes. The y-axis shows the GO term, and the x-axis shows the number of dysregulated miRNA target genes in the term. **E**, The 30 most enriched KEGG pathways based on dysregulated miRNA targeting genes. The x-axis shows the enrichment score, and the y-axis shows the rich factor. The point size represents the number of genes enriched in a pathway, and point color represents Q value range.

3.4 差异表达 circRNAs 的亲本基因主要参与癌变、细胞抗病毒和细胞炎症相关的信号通路

circRNAs 测序结果显示, HepG 2 和 HepG 2.2.15 细胞系的 circRNAs 表达谱有显著性差异(图 3.4 A)。用火山图筛选法鉴定获得差异表达 circRNAs 251 条(变化倍数 ≥ 2.0 和 $P < 0.05$) (图 3.4 B), 其中 186 个在 HepG 2.2.15 细胞中表达上调, 65 个表达下调(图 3.4 C)。为验证测序数据的可信度, 随机选择了 5 个 circRNAs (Circ_RNF 220, chr 1: 44877653-44878394; Circ_RAB3IP, chr 12: 70193989-70195501; chr 14: 40124049-40125012; Circ_PDE8A, chr 15: 85657104-85658718; Circ_CREBBP, chr 16: 3900298-3901010) 设计发散引物通过 real-time PCR 检测其表达水平。Real-time PCR 结果与细胞全转录组测序结果一致, 表明测序结果可靠(图 3.4 D)。

为进一步探讨 HBV 感染后 circRNAs 的异常表达与 HCC 的关联, 对差异表达的 circRNA 的亲本基因进行 GO 和 KEGG 富集分析 (P 值 < 0.05)。选择 P 值 < 0.05 的 GO 条目, 按 P 值对其进行排序。结果表明显示差异表达 circRNAs 的亲本基因主要富集在细胞进程 (cellular processes), 生物调节 (biological regulation), 代谢调节, 催化活性 (catalytic activity), 结合活性 (binding activity), 大分子复合物 (macromolecular complex)、细胞器组分 (organelle part) 和细胞组分 (Cell part) 等亚类 (图 4 E)。KEGG 通路富集表明, 差异表达 circRNAs 的亲本基因主要富含与癌症相关的信号通路, 如 Wnt 信号通路 (Wnt signaling pathway), p53 信号通路 (p53 signaling pathway), 癌症通路 (pathways in cancer), 病毒性癌症通路 (viral carcinogenesis), Ras 信号通路 (Ras signaling pathway), mTOR 信号通路 (mTOR signaling pathway), hippo 信号通路 (hippo signaling pathway) 和 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) (图 3.4 F)。此外, 还有一些差异表达 circRNAs 的亲本基因参与了细胞抗病毒和细胞炎症相关的信号通路, 如 T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway), 乙型肝炎途径 (hepatitis B pathway), 细胞粘附分子 (cell adhesion molecules), 抗原处理和呈递通路 (antigen processing and presentation pathways) (图 3.4 F), 表明这些差异表达的 circRNAs 的亲本基因可能参与了对 HBV 感染的免疫应答, 并能帮助 HBV 实现免疫逃逸。另外, 一些差异

表达 circRNAs 的亲本基因还参与了 RNA 运输和 RNA 降解途径 (图 3.4 F), 表明这些途径也与 HBV 感染有关。



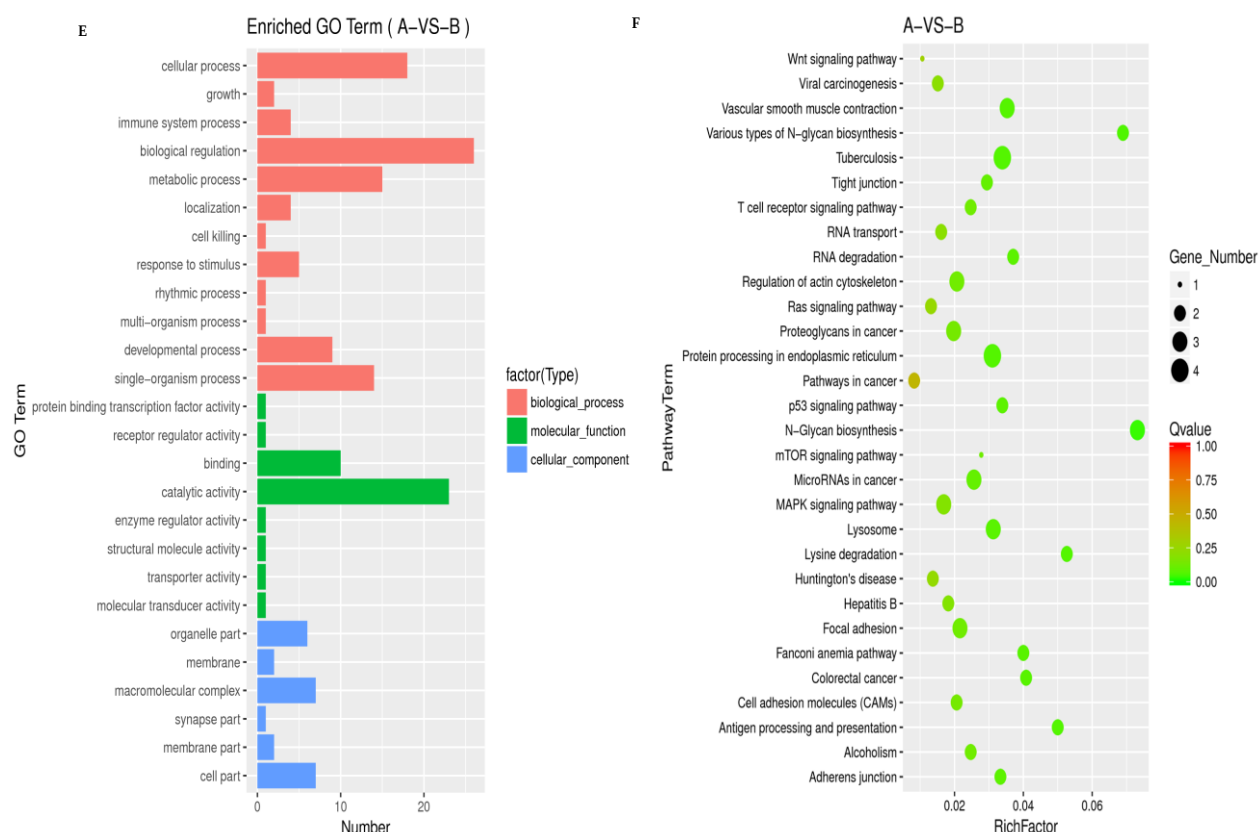


图 3.4 差异表达的 circRNA 的亲本基因主要参与癌症, 细胞抗病毒以及细胞炎症相关通路

A, 聚类分析热图表示 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞间差异表达的 circRNA, 红色代表高表达 circRNA, 绿色代表低表达 circRNA。 **B**, 火山图显示 circRNA 的数量和分布。 **C**, 在 HepG2.2.15 细胞中上调和下调的 circRNA 个数。 **D**, 通过 real-time PCR 在 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中以及 HBV 阳性 和 HBV 阴性的肝癌组织中验证差异表达的 circRNA 的表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达水平。 **E**, 差异表达的 circRNA 的亲本基因的 GO 富集分析。y 轴表示 GO 条目, x 轴表示在该 GO 条目中富集的基因个数。 **F**, KEGG 富集分析的前 30 条通路。x 轴表示富集因子, y 轴表示通路名称。点的大小代表在一个通路中富集的基因数量, 而点的颜色代表 Qvalue 范围。

Figure 3. 4. Hosting genes of differently expressed circRNAs are mainly involved in

carcinogenesis, cellular antiviral, and cellular inflammation-related signaling pathways.

A, The clustered heat map showing differentially expressed circRNAs from HepG2 cell line compared with HepG2.2.15 cell line. Red indicates high expression circRNAs, green indicates Low expression of circRNA. **B**, Volcano plot shows the number and distribution of circRNAs in the same plane. **C**, The number of upregulated and downregulated circRNAs in HepG2.2.15 cell line. **D**, Validation of circRNAs expression with real-time PCR in HepG2, HepG2.2.15 cell lines and HBV-positive and HBV -negative liver cancer tissue. The expression of six circRNAs were analyzed from the whole transcriptome sequencing with real-time PCR. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to normalize the relative gene expression data. **E**, GO function enrichment of dysregulated circRNA hosting genes. The y-axis shows the GO term, and the x-axis shows the number of dysregulated circRNA hosting genes in the term. **F**, The 30 most enriched KEGG pathways based on dysregulated circRNA hosting genes. The x-axis shows the enrichment score, and the y-axis shows the rich factor. The point size represents the number of genes enriched in a pathway, and point color represents Qvalue range.

3.5 circRNA-miRNA-mRNA 网络调控癌症相关和抗病毒相关的信号通路

最近的研究表明, circRNA 作为 miRNA 的“海绵”, 能竞争性地与 miRNAs 结合, 间接调控基因表达。通过对 HBV 阳性细胞 HepG2.2.15 细胞系中差异表达的 mRNAs、miRNAs 和 circRNAs 的整合分析, 构建了 HBV 阳性细胞内的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络。发现表达水平上调的 circRNA CIRC_FIRRE 1 (chrX: 130870155~130928494)分别与 Novel miRNA-631 和 Novel miRNA-969 互作调控 86 和 22 条 mRNAs 的水平, 下调的 circRNA CIRC_FIRRE 2 (chr 11: 22696396-22777499)与 Novel miRNA-323 互作调控 22 条 mRNAs 的水平(图 3.5)。有趣的是, CIRC_FIRRE 1 和 CIRC_FIRRE 2 都来自基因 FIRRE (firre intergenic repeating RNA element), FIRRE 是一个包含重复序列的长链非编码 RNA, 它能在先天免疫应答过程中调控 mRNA 的稳定性。

为了探讨 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络中的作用, 对该调节网络中差异表达的 mRNAs 进行了 GO 注释, 结果显示调控网络中的靶 mRNA 主要富集在

细胞进程、生物调节和生物进程，结合活性、催化活性，信号转导活性，细胞组分、细胞器组分等亚类(图 3.6 A)。调节网络中差异表达的 mRNAs 的 KEGG 通路分析显示，这些靶 mRNAs 参与了癌症的发生相关通路(癌症、子宫内膜癌的转录失调)和抗病毒相关的信号通路(Toll 样受体信号通路, RIG-1 受体信号通路和 IL-17 信号通路)。如调控网络 CIRC_FIRRE 1- Novel miRNA-631- ITGB/AKT 以及 CIRC_FIRRE 2-Novel miRNA-323-ECM1 能调控细胞周期进程和细胞凋亡。此外，调控网络 CIRC_FIRRE 1- Novel miRNA-631- TOLLIP/AKT 以及 CIRC_FIRRE 2-Novel miRNA-323- CD 40 参与调控了 Toll 样受体信号通路(图 3.5, 3.6 B)。

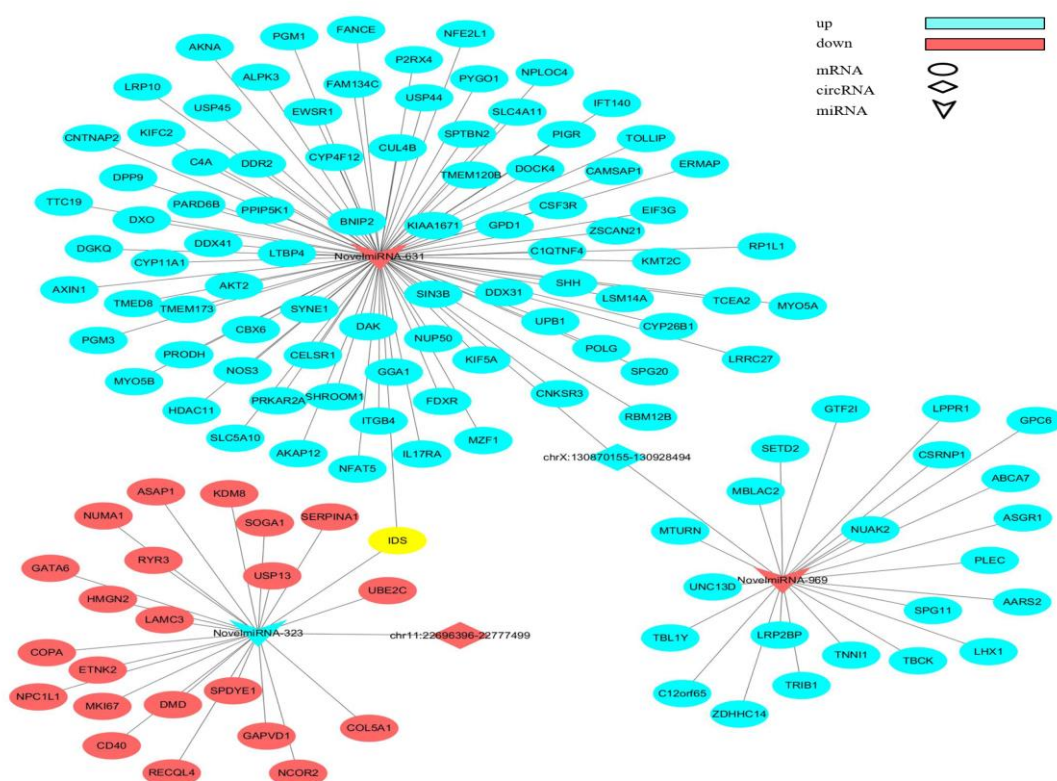


图 3.5 CircRNA 通过竞争性结合 miRNA 调控细胞基因表达

ceRNA 作用网络是基于 circRNA-miRNA-mRNA 之间的相互作用。边缘的线代表序列配对，椭圆代表编码蛋白的基因，三角形代表 miRNA，菱形代表 circRNA。蓝色表示下调，红色表示上调。

Figure 3.5 CircRNAs potentially regulated cellular genes by competitively binding cellular miRNA.

The ceRNA networks were based on circRNA–miRNA–mRNA interactions. The edges represent sequence matching. A round node represents a protein-coding gene, a triangular node represents a miRNA, and a diamond node represents a circRNA. Blue indicates up-regulation, red indicates down-regulation.

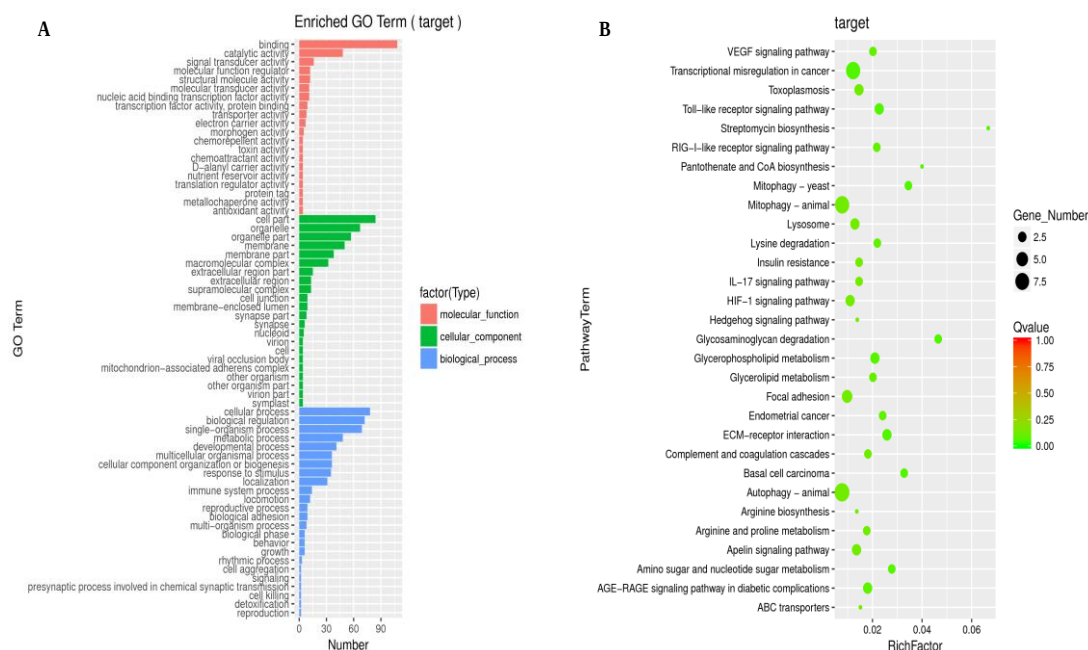


图 3.6 HepG2.2.15 细胞中 circRNA–miRNA–mRNA 调控网络的靶基因的 GO 及 KEGG 分析

A, 差异靶基因的 GO 富集分析。y 轴表示 GO 条目, x 轴表示在该 GO 条目中富集的基因个数。**B**, KEGG 富集分析的前 30 条通路。x 轴表示富集因子, y 轴表示通路名称。点的大小代表在一个通路中富集的基因数量, 而点的颜色代表 Qvalue 范围。

Figure 3.6 GO function and KEGG pathway enrichment analysis of the target genes in the network of circRNA–miRNA–mRNAs in HepG2.2.15 cell line.

A, GO function enrichment of the target genes. The y-axis shows the GO term, and the x-axis shows the number of dysregulated target genes in the term. **B**, The 30 most enriched KEGG pathways based on dysregulated circRNA hosting genes. The x-axis shows the enrichment score, and the y-axis shows the rich factor. The point size represents the number of genes enriched in a pathway, and point color represents Qvalue

range.

4.讨论

HBV 能引起肝硬化和肝细胞癌等严重的肝脏疾病, 据报道, 慢性 HBV 感染是肝细胞癌发生的主要原因^[13]。在过去的几十年中, 乙肝相关的肝癌发生、发展机制研究的主要集中在病毒和细胞编码的 mRNA、miRNA 和 lncRNA。近年来, 发现了一种由 RNA 反向剪接而产生的 circRNA 分子, 目前, circRNA 已成为研究领域的热点, 在真核生物的转录本中非常普遍^{[14][16]}。已有证据表明, circRNA 与疾病的发生发展密切相关, 已成为包括 HBV 相关肝癌在内的诸多疾病的生物检测标志物和潜在的治疗靶点^{[17][20]}。Huang 等人已对乙肝相关肝癌和其癌旁的 circRNAs 的表达变化及功能进行了比较分析, 发现在 HBV 感染的情况下, 肝癌组织和癌旁组织中 circRNA 的表达模式发生明显改变^[21]。HCC 细胞已经成为体外研究肝癌发生发展机制的有力工具, 如抗癌药物的研究, 肝癌相关的自噬与凋亡研究^{[22][23]}, 然而, 应对 HBV 感染, HCC 细胞的 circRNAs 表达水平如何变化? 这种变化与肝癌的发生、发展有何关系目前仍不清楚。本研究以 HepG2.2.15 细胞为模型, 通过全转录组测序, 从全转录组水平探讨了细胞对 HBV 感染的应答, 发现在病理条件下 mRNAs、miRNAs 和 circRNAs 的表达均发生了改变。首先, 我们发现差异表达的 mRNA 主要参与 RNA 降解、细胞周期和 p53 等信号通路, 细胞周期和 p53 等通路都是与癌症密切相关的信号通路。另外, 我们还发现差异表达的 miRNAs 的靶基因也主要参与癌症相关的信号通路, 表明癌症相关的 mRNA 和 miRNA 都对 HBV 感染做出了应答。此外, 在 HepG 2.2.15 和 HepG 2 细胞中分别表达了 13026 和 5672 个 circRNA, 在 HepG 2.2.15 和 HepG 2 细胞中共表达的 circRNA 中, HepG 2.2.15 细胞中有 186 个 circRNA 表达水平上调, 65 个表达水平下调, 表明 HBV 的感染不仅导致了 circRNAs 数量增加, 而且丰度也发生了改变。以往的研究结果显示, NF 90/NF110 (也称为 ILF 3) 定位在细胞核中, 可促进 circRNA 的产生, 但病毒感染后, NF90/NF110 可从细胞核进入细胞质, 核内 NF90/NF110 减少导致 circRNAs 表达下降^[24]。本研究的 RNA 转录组测序结果显示, HBV 阳性 HepG 2.2.15 细胞中, NF90/NF110 的表达水平增加, 因此可以认为 NF90/NF110 的高表达导致 HBV 感染后细胞中 circRNA 数量、丰度没有降低。

HBV 的主要特征之一是它可以逃避复杂的适应性免疫系统,并且可在患者的整个生命周期中持续存在^[25]。已有研究结果表明 HBV 慢性感染与 HCC 的发生有密切关系^[26]。HBV 基因组包含四个重叠的开放阅读框架,包括 preS1/preS2/S, preCore/Core, X 和 POL^[27]。近年来,越来越多的证据表明,HBX 作为癌基因或肝癌发生的辅助因子,能通过改变 MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路和 p53 通路等途径促进肝癌的发生^{[25][28][29]}。在本研究中,我们通过全转录组测序,探讨了 circRNA 异常表达与病毒感染和细胞抗病毒免疫应答之间的潜在联系。基于差异表达 circRNA 的亲本基因及 circRNA-miRNA-mRNA 调控的 mRNAs 的 KEGG 通路富集分析发现 HBV 感染可影响多种致癌信号通路(如 Wnt、p53 和 PI3K/Akt 信号通路)和免疫信号通路(如 T 细胞受体,抗原处理、呈递信号通路, toll 样受体信号通路)。RNA 测序数据显示,HBV 阳性细胞中 AKT 和 ITGB 4 基因的表达水平上调。以往的研究结果显示,AKT 与肿瘤细胞的存活、增殖和侵袭性有关,AKT 在人类肿瘤和肿瘤细胞中的激活也是最常见的改变之一^[30]。此外,高表达的 ITGB 4 基因通过与粘着斑激酶相互作用能促进结肠癌的发生^[31]。在本研究中,通过对全转录组的整合分析发现, AKT 和 ITGB 4 表达可能受到 CIRC_FIRRE1-NovelmiRNA-631-AKT 和 CIRC_FIRRE1-NovelmiRNA-631-ITGB 4 网络的调节,即 HBV 感染提高了 CIRC_FIRRE1 的表达,通过与 NovelmiRNA-631 互作,提高 AKT、ITGB 4 表达水平,从而促进肿瘤的发展。最近的一项研究表明 SV40 感染可能会影响非洲绿猴肾源性 Vero 细胞内 circRNA 的表达模式,差异表达的 circRNAs 参与各种癌症相关通路^[11]。此外,也有研究指出, circRNAs 能介导禽类白血病病毒在鸡体内诱导肿瘤的形成^[32]。这些研究表明,病毒感染后,机体的 circRNA 表达水平会做出相应的应答,从而影响癌症相关通路。因此我们推测, HBV 感染后检测到的部分差异表达的 circRNAs 可能具有 Cir-ITCH、CiRS-7 类似的作用,是肿瘤诱导和发展的促进因子^{[33][34]}。越来越多的证据表明,部分 circRNAs 可以通过与蛋白质相互作用^[35],或通过帽子结构非依赖方式编码蛋白发挥作用^{[36][37]}。本研究发现的差异表达的 circRNA 是否能与蛋白质结合或翻译蛋白以促进 HCC 的发生仍有待于进一步的研究。有趣的是,我们将全转录组测序数据映射到 HBV 基因组时发现有一些 circRNA 可能来自于病毒。由于病毒来源 circRNA 的报道非常有限,而病毒来源 circRNA 是否具有生物学功能?目前还没有相关方面的

研究报道,因此我们的后续研究重点围绕 HBV 编码的 circRNA 的鉴定及其在 HCC 发生发展中的功能和作用机制开展。

参考文献

- [1] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions[J]. Development, 2016, 143(11): 1838-1847.
- [2] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 9331-9342.
- [3] Ebert M S, Sharp P A. MicroRNA sponges: progress and possibilities[J]. RNA, 2010, 16: 2043–2050.
- [4] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J] Cell,2011, 146: 353–358.
- [5] Cesana M, Daley G Q. Deciphering the rules of ceRNA networks[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 2013, 110: 7112–7113.
- [6] Wang LK, Chen XF, He DD, et al. Dissection of functional lncRNAs in Alzheimer's disease by construction and analysis of lncRNA-mRNA networks based on competitive endogenous RNAs [J]. Biochem. Biophys. Res Commun,2017, 485: 569–576.
- [7] Song X, Cao G, Jing L, et al. Analysing the relationship between lncRNA and protein-coding gene and the role of lncRNA as ceRNA in pulmonary fibrosis[J]. J. Cell. Mol. Med, 2014,18: 991–1003.
- [8] Conte F, Fiscon G, Chiara M, et al. Role of the long non-coding RNA PVT1 in the dysregulation of the ceRNA-ceRNA network in human breast cancer[J]. PLoS one, 2017, 12: e0171661.
- [9] Chiu Y C, Hsiao T H, Chen Y, et al. Parameter optimization for constructing competing endogenous RNA regulatory network in glioblastoma multiforme and other cancers [J]. BMC Genomics, 2015, 16(Suppl. 4), S1.
- [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] Shi J, Hu N, Li J, et al. Unique expression signatures of circular RNAs in response to DNA tumor virus SV40 infection[J]. Oncotarget, 2017, 8(58): 98609-98622.
- [12] Zhang X, Min Z , Rong Y , et al. Identification and comparison of novel circular RNAs with associated co-expression and competing endogenous RNA networks in

- pulmonary tuberculosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 113571-113582.
- [13] Ely A , Arbuthnot P . Differing prospects for the future of using gene therapy to treat infections with hepatitis B virus and hepatitis C virus[J]. *Discovery Medicine*, 2015, 20(109):137-143.
- [14] Hayashi M , Deng L , Chen M , et al. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the lysine methyltransferase SET and MYND domain-containing 3 induces activator protein 1 activation[J]. *Microbiology and Immunology*, 2016, 60(1):17-25.
- [15] Deng M , Hou J , Hu J , et al. Hepatitis B virus mRNAs functionally sequester let-7a and enhance hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2016, 62.
- [16] Levrero M , Zucmanrossi J . Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma.[J]. *Journal of Hepatology*, 2016, 64(1):S84.
- [17] Luka B , Metka R G , Damjan G . Circular RNAs: Biogenesis, Function, and a Role as Possible Cancer Biomarkers[J]. *International Journal of Genomics*, 2017, 2017:1-19.
- [18] Panda A C, Grammatikakis I , Munk R , et al. Emerging roles and context of circular RNAs[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2016.
- [19] Beermann J , Piccoli M T , Viereck J , et al. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches[J]. *Physiological Reviews*, 2016, 96(4):1297-1325.
- [20] Xie W, Yuan S, Sun Z, et al. Long noncoding and circular RNAs in lung cancer: advances and perspectives[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(9):1275-1287.
- [21] Huang XY, Huang ZL, Xu YH, 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]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):5428.
- [22] Sun X , Li L , Ma H G , et al. Bisindolylmaleimide alkaloid BMA-155Cl induces autophagy and apoptosis in human hepatocarcinoma HepG-2 cells through the NF- κ B p65 pathway[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(4):524-538.
- [23] Xu W, Pan Y, Wang H , et al. Synthesis and Evaluation of New Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents in HepG-2 Cell Line[J]. *Molecules*, 2017, 22(3):467.
- [24] Li X , Liu C X , Xue W , et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67: 214-227.

- [25]Edamoto Y , Hara A , Biernat W , et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis[J]. International Journal of Cancer, 2003, 106(3):334-341.
- [26]Peters MG. Hepatitis B Virus Infection: What Is Current and New[J]. Top Antivir Med. 2019, 26(4):112-116.
- [27]Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications[J]. Journal of Hepatology, 2014, 61(2):408-417.
- [28]Tommasi S , Pinto R , Pilato B , et al. Molecular Pathways and Related Target Therapies in Liver Carcinoma[J]. Current Pharmaceutical Design, 2007, 13(32):3279-3287.
- [29]McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance[J]. Adv Enzyme Regul ,2006, 46:249–279.
- [30]Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A ,1999. 96(5):2110-2115.
- [31]Tai Y L , Lai I R , Peng Y J , et al. Activation of focal adhesion kinase through an interaction with $\beta 4$ integrin contributes to tumorigenicity of colon cancer[J]. FEBS Letters, 2016, 590(12):1826-1837.
- [32]Zhang X , Yan Y , Lei X , et al. Circular RNA alterations are involved in resistance to avian leukosis virus subgroup-J-induced tumor formation in chickens[J]. Oncotarget, 2017, 8(21):34961-34970.
- [33]Li F, Zhang L, Li W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncotarget. 2015, 6(8):6001-6013.
- [34]Yu L , Gong X , Sun L , et al. The Circular RNA Cdr1as Act as an Oncogene in Hepatocellular Carcinoma through Targeting miR-7 Expression[J]. PLOS ONE, 2016, 11(7):e0158347.
- [35]Du W W , Yang W , Liu E , et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(6): 2846-2858.
- [36]Yang Y, Gao X, Zhang M, et al. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis[J]. J Natl Cancer Inst. 2018,110(3):304–315.

- [37]Zhang M, Huang N, Yang X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene*[J]. 2018,37(13):1805–1814.

第四章 来源于 HBV 的 circRNA 的鉴定

摘要:

目前已发现部分 DNA 病毒的转录本可以通过反向剪接形成 circRNA, 为了求证 HBV 是否能形成 circRNA, 将 HBV 阳性肝癌细胞 HepG2.2.15 的 circRNA 数据与 HBV 病毒基因组数据进行比对, 发现 1 条 HBV 可能编码 circRNA, 其序列与基因组上 489-2985 nt 区域完全匹配, 长度约 2.5 kb, 命名为 HBV_circ_1。为了鉴定 HBV 编码 circRNA 的真实性, 利用发散引物进行反向 PCR, PCR 产物的 Sanger 测序结果显示, HBV 起源的 circRNA HBV_circ_1 的确存在剪接的 Junction site, 且其侧翼序列与高通量测序结果一致。利用靶向 Junction site 的寡核苷酸探针进行 Northern blotting 检测, 进一步确认 HepG2.2.15 细胞中存在 HBV_circ_1。组织原位杂交结果显示, HBV_circ_1 也存在于 HBV 相关肝癌临床样本中。比较 HBV pgRNA 与 HBV_circ_1 序列, 推测 HBV_circ_1 起源于 pgRNA, 是 HBV 编码的一个新 RNA 分子。此外, 组织芯片分析结果显示, HBV_circ_1 在肝癌组织中的表达水平显著性地高于癌旁组织, 暗示 HBV_circ_1 可能参与肝细胞癌的发生和/或发展。

关键词: circRNA, HBV, HBV_circ_1, 鉴定

1 前言

随着技术手段的不断进步, 发现了越来越多的 circRNAs。目前的研究结果表明 circRNAs 由四种环化机制产生的 (图 1.1), 包括内含子互补配对, 套索驱动中环化, 内含子环化和 RNA 结合蛋白 (RBP) 驱动中环化^[1]。普通的线性 RNA 分子对 RNase R 酶敏感, 而 circRNA 是一个环状闭合分子, 没有游离的 5' 及 3' 端, 具有 RNase R 酶耐受性。目前鉴定 circRNAs 通常所用的方法是: 首先将 RNase R 酶处理过的 RNA 进行 circRNA 高通量测序; 接着设计发散引物 (divergent primers), PCR 扩增 circRNA 反向剪接的连接位点 (back-splicing junction site), 进一步 Sanger 测序验证位点的正确性^[2]。circRNA 的验证引物设计与通常线性 RNA 的引物设计不同, 它需要确定一段序列是否成环。因此, circRNA 验证引物需设计在

junction site 两侧，确保 PCR 扩增片段包含 junction site，其原理如图 4.1 所示。由于获取到的序列为 circRNA 从连接位点（junction site）处打开后的线性序列，应先进行序列位置变换后再进行引物设计，故 divergent primer 能用来验证一段序列是否成环，而 convergent primer 用来扩增线性 RNA。此外，还可以针对 junction site 设计探针通过 Northern blotting、原位杂交等方法鉴定 circRNAs。

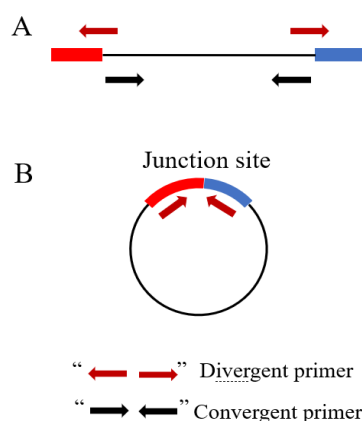


图 4.1 circRNA 验证引物设计原理图

A, 发散引物在线性 RNA 分子上的示意图。B, 对应的反向引物在环状 RNA 分子上的示意图。

Figure 4.1 The schematic diagram of circRNA primers

A, Schematic Diagram of divergent primer on linear RNA. B, The corresponding divergent primers on the circular RNA.

与细胞不同，病毒的基因组大小十分有限。充分利用它们有限的基因组尽可能编码更多的信息是病毒与宿主博弈的一种重要策略。越来越多的研究表明病毒基因组除了能编码蛋白，还可以产生非编码 RNA，并且在调节细胞或病毒本身的基因表达方面发挥重要作用^[3]。近些年，关于病毒 ncRNA 参与疾病的过程的报道也越来越多。EB 病毒（Epstein-Barr virus, EBV）编码的小非加尾 RNA（EBER）直接影响鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma, NPC）的发病^[4]，EB 病毒编码的 EBER 能抵抗各种诱导细胞凋亡的刺激并有助于维护伯基特淋巴瘤（Burkitt 淋巴瘤）的恶性表型。在肠 407 细胞中，转染 EBER 基因能明显保护细胞免受 Fas 介导的吞噬^[5]。人类腺病毒（adenovirus, ADV）可编码病毒相关 RNA（VAI 和 VAII），

病毒在感染细胞复制期间 VA I 具有抑制 RNAi 的作用, 阻止 RNAi 沉默复合物发挥作用^[6]。猿猴病毒 (Simian virus 40, SV40) 可编码 miRNAs, 调控病毒基因的表达和降低细胞毒性 T 细胞的易感性^[7]。卡波西肉瘤疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 病毒同样能形成功能性 miRNAs。业已明确, KSHV miR-K12-1 可通过下调 p21 基因的表达水平促进病毒诱导的肿瘤形成^[8]。此外, KSHV miR-K12-10a 还能抑制宿主的促炎反应^[9]。除了能编码 miRNA, KSHV 还能编码长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。来源于 KSHV 的长链非编码聚腺苷化核 RNA (Polyadenylated nuclear RNA) 能在转录水平调控宿主和病毒基因的表达^[10]。最新的研究结果显示, 除了细胞转录本能形成 circRNAs 外, DNA 病毒 EBV 和 KSHV 其具有内含子序列的初级转录本也可以通过反向剪接形成 circRNAs^{[11][12]}。

上一章节研究结果显示 HBV 感染改变了细胞 circRNA 的表达水平, 且有可能通过 circRNA-miRNA-mRNA 网络调节 HCC 的发生、发展。有趣的是 circRNA 测序结果暗示 HBV 阳性的细胞中可能存在 HBV 起源的 circRNA, 因此, 在本研究中我们利用反向 PCR、Sanger 测序、Northern blot、组织芯片进一步证实 HBV 能编码 circRNA, 并发现 HBV 编码的 circRNAs 在 HBV 相关的肝癌及癌旁组织中的表达水平存在差异, 暗示 HBV 编码的 circRNAs 可能参与肝细胞癌的发生和/或发展, 这可能为研究 HBV 相关肝癌的发生、发展机制提供新的视角, 也有可能为 HBV 相关肝癌药物的研发提供新的分子靶标。

2 材料与方法

2.1 实验试剂

Taq DNA 聚合酶为 Fermentas 公司产品。DNA 胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品。DNA 标准分子量 Marker 为北京全式金公司产品。RNAiso Plus 试剂购自 TaKaRa 公司。反转录试剂盒及 real-time PCR 检测试剂盒均购自北京全式金公司。Northern 杂交试剂盒, 尼龙膜购自 Abcam 公司, 检测生物素标记的核酸试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。Ribonuclease R (RNase R) 购自 Epicentre 公司。原位杂交试剂盒购自南京博士德生物公司, 肝癌组织芯片购自上海卓灏医药公司。HBV 的 S 蛋白抗体购自 Abcam 公司。DAPI 购自碧云天生物技术公司。地高辛标记试剂盒为

罗氏产品。HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自 Protech 公司。

2.2 高通量测序技术分析及数据质量控制

高通量测序技术分析及数据质量控制参照第三章材料与方法 2.3 及 2.4。

2.3 HBV 编码的 circRNAs 预测

用 findcirc 软件基于 HBV 基因组序列信息对 circRNA 进行预测。用 Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>) 将 HBV 阳性细胞 circRNA 测序所获的 clean reads 与 HBV 参考基因组比对, 采用反向剪接 (back-splice) 的算法从 unmapped reads 提取反向剪切的 junction, 最后将软件提取出 circRNA 作为潜在的 HBV 编码的 circRNA。

2.4 反向 PCR

根据高通量测序预测结果, 针对 HBV_circ_1 的 junction 位点序列设计发散引物 (divergent primers) (primer set# F489: TTGAGCAGTAGTCATGCAGG 和 R2985: GATTCTTTCCCGACCACC)。提取总 RNA (方法同前一章节), 然后用 RNase R 酶去除线性 RNA, 取 2 μ g 回收的 RNA 用随机引物反转录成 cDNA, 用发散引物 PCR 扩增, PCR 体系如下:

10 $\times$ PCR buffer	2.5 μ L
Mg ²⁺	2 μ L
dNTPs (2.5 mmol/L)	1 μ L
模板 cDNA	1 μ L
引物 1 (100 pmol/L)	0.5 μ L
引物 2 (100 pmol/L)	0.5 μ L
Taq 酶 (1U/ μ L)	1 μ L
ddH ₂ O 补足体积至	25 μ L

PCR 程序设置如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的条带, 克隆进 T 载体后送上海生工进行 Sanger 测序。

2.5 Northern blotting

- 1) 实验器具用 RNA 酶去除剂进行处理备用
- 2) 配制变性琼脂糖凝胶: 称取 1g 琼脂糖至 90ml DEPC 水进行融胶, 胶融之

后再向其中加入 10 ml 甲醛，室温凝固。

3) 准备 RNA 电泳样品：20 μg RNA 与 5 μL loading 缓冲液及 1 μL gel red 混匀

4) 以 5V/cm 电泳 30 min，电泳结束后用保鲜膜包好凝胶在紫外成像系统上拍照（注：此步骤时间不能太长）

5) 采用虹吸法进行转膜，转膜结束后进行紫外交联

6) 预杂交：预杂交液 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热，然后加到膜上，42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 1 h

7) 杂交：生物素标记的探针（5'Biotin-GTGGTTGAGGATCCTTGTTGGCGTCTG）由上海生工合成，用 10 pM 探针 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜

8) 洗膜：用低强度洗膜液在室温条件下洗膜 2 次，每次 5 min，然后再用高强度洗膜液在杂交温度下洗膜 2 次，每次 2 min

9) 用专门检测生物素标记的核酸的试剂盒检测杂交信号

2.6 组织芯片免疫荧光

2.6.1 相关试剂配制

1) TPBS：1 $\times$ PBS 中加入占总体积 0.05% 的吐温试剂。

2) EDTA 抗原修复液：50 $\times$ EDTA（pH=9.0）稀释至 1 $\times$ 。

2.6.2 实验步骤

1) 脱蜡：将组织芯片放入 63 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘烤 1h，结束后，移至摇床进行脱蜡，脱蜡过程如下：二甲苯 2 次，每次 15min $\rightarrow$ 无水乙醇 2 次，每次 7min $\rightarrow$ 90%乙醇 1 次，7min $\rightarrow$ 80%乙醇 1 次，7min $\rightarrow$ 70%乙醇 1 次。

2) 取出芯片用 ddH₂O 冲洗 3 次，每次 3min（冲洗过程中将 EDTA 抗原修复液进行加热）。

3) 抗原修复：EDTA 抗原修复液加热沸腾后，将芯片放入，计时 20min。

4) 阻断内源性过氧化物酶活性：配制内源性过氧化物酶阻断剂（38.4 ml 无水甲醇+12 ml 30%浓度的 H₂O₂+9.6ml ddH₂O），将芯片浸入阻断剂孵育 10min。

5) 一抗孵育：取出芯片，用 1 $\times$ PBS 缓冲液冲洗 3 次，一次 5min。滴加 S 蛋白鼠抗（1: 1000），于湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

6) 二抗孵育：从 4 $^{\circ}\text{C}$ 取出湿盒，静置 1h 至室温，PBST 缓冲液洗片 3 次，每次 5min。滴加 FITC 标记的羊抗鼠二抗（1: 400），避光孵育 1h，PBST 缓冲液洗

片 3 次, 每次 5min, ddH₂O 洗 1 次。

7) DAPI 染色: 滴加 DAPI (1: 10000), 避光 10min。

8) PBST 缓冲液洗片 10 min, 封片剂封片, 待镜检。

2.7 地高辛标记探针制备

1) 1 μ g DNA 模板 (线性或超螺旋) 加入 dd H₂O 中至终止体积 16 μ L。

2) DNA 模板通过沸水浴 10min 作变性处理, 变性后立即放冰上防止复性。(为获得高效的标记产物, 模板必须完全变性。)

3) 将地高辛标记的试剂盒中 dig-high primer (管 1) 混匀, 取 4 μ L 加入变性的 DNA 中, 混匀后简单离心, 然后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或孵育过夜。(延长孵育时间能提高效率)

4) 加 2 μ L 0.2 M EDTA 终止反应或 65 $^{\circ}$ C 10 min 灭活。

2.8 原位杂交

1) 脱蜡: 将组织芯片放入 63 $^{\circ}$ C 烘箱烘烤 45 min, 烘烤完成后, 放入摇床进行脱蜡, 脱蜡过程如下: 二甲苯 3 次, 每次 5 min $\rightarrow$ 无水乙醇上下浸洗 10 次 $\rightarrow$ 重复上一步操作 $\rightarrow$ 无水乙醇 1 次, 5 min $\rightarrow$ 96% 乙醇上下浸洗 10 次 $\rightarrow$ 96% 乙醇 1 次, 5 min $\rightarrow$ 70% 乙醇上下浸洗 10 次 $\rightarrow$ 70% 乙醇 5 min $\rightarrow$ 1 $\times$ PBS 洗 2 次, 每次 5 min。

2) 蛋白酶消化, 暴露核酸片段: 滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 (1ml 3% 柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶)。

3) 预杂交: 每枚芯片加 60 μ L 预杂交液, 然后放入湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。

4) 杂交: 稀释探针至 0.5-2 μ g/ml, 加 60 μ L 探针, 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜。(注意: 需加盖玻片)

5) 杂交后洗涤: 去掉盖玻片, 37 $^{\circ}$ C 按下列步骤进行洗涤: 用 5 $\times$ SSC 在 37 $^{\circ}$ C 条件下洗涤 5 min $\rightarrow$ 用 2 $\times$ SSC 在 37 $^{\circ}$ C 条件下洗涤 2 次, 每 5 min $\rightarrow$ 用 0.5 $\times$ SSC 在 37 $^{\circ}$ C 条件下洗涤 15 min $\rightarrow$ 用 0.2 $\times$ SSC 在 37 $^{\circ}$ C 条件下洗涤 2 次, 每次 15 min。

6) 滴加封闭液: 37 $^{\circ}$ C 30 min。(可延长封闭时间至 2h, 提高特异性)。

7) 滴加生物素化鼠抗地高辛: 37 $^{\circ}$ C 60 min 或室温 120 min, 然后用 0.5M PBS 洗 4 次, 每次 5 min。

8) 滴加 SABC: 37 $^{\circ}$ C 20 min 或室温 30 min, 尔后用 0.5 M PBS 洗 5 min $\times$ 4 次。

9) 滴加生物素化过氧化物酶: 37°C 20 min 或室温 30 min, 尔后用 0.5 M PBS 洗 5 min×4 次。

10) DAB 显色: 取 1 ml 6×DAB, 用 5ml TBE 稀释, 加入 2μL H₂O₂ 配制成显色液。滴加显色液, 在显微镜下观察显色, 30 min 以内, 若无背景需继续显色, 最后充分水洗。

11) 苏木素复染: 用蒸馏水清洗芯片→用苏木素染液染细胞核, 室温孵育 5-10 min→自来水冲洗 5 min→用 0.1% 的盐酸-乙醇分化 10-30s (用无水乙醇配制 0.1% 的盐酸)→自来水洗 1 min→在 PBS/PBST 中脱色反应 30-60s→自来水洗 5 min→用 95% 乙醇脱水两次, 每次 5 min→在二甲苯中透明两次, 每次 5 min→显微镜观察, 拍照。

2.9 Real-time PCR 验证临床组织样本中 HBV_circ_1 的表达水平

HBV 阳性肝癌组织和癌旁组织从江苏省苏州市苏州大学第一附属医院收集。按照说明书用 RNAiso Plus 提取 0.05g 肝癌组织/癌旁组织的总 RNA。Nanodrop 2000 测定 RNA 浓度, RNase R 酶消化总 RNA, 按 1U RNase R 酶消化 1μg RNA 加样, 以消除线性 RNA 的干扰, 然后 2 μg 消化后的 RNA 用随机引物反转录合成 cDNA, 用表 4.1 中的 HBV_circ_1 定量引物检测差异表达的 circRNA。以人 β-actin 基因作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 RNA 的表达水平。Real-time PCR 反应体系为: 2×TransStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL (1 μmol), cDNA 模板 0.1μL, 加水至 20 μL。Real-time PCR 程序设置如下: 95°C 预变性 3 min; 随后 39 个循环: 95°C 10sec, 60°C 1 min。每个样品重复 3 次。

表 4.1 HBV_circ_1 定量引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
HBV_circ_1	TTGAGCAGTAGTCATGCAGG	GATTCTTTCCCGACCACC
β-actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC

2.10 数据处理

采用 GraphPad Prism 6 软件对数据统计分析, *代表 P 值 ≤ 0.05 , **代表 P 值 ≤ 0.01 , ***代表 P 值 ≤ 0.001 。

3 结果与分析

3.1 HBV 可编码 HBV_circ_1

为了明确 HBV 是否能编码 circRNA, 我们对 HepG2.2.15 肝癌细胞进行 circRNA 测序, 将不能与细胞基因组匹配的序列映射至 HBV 基因组 (3.2 kb), 发现 1 个潜在 HBV 编码的 circRNA, 其序列与基因组上 489-2985 nt 区域匹配, 长度约 2.5 kb, 命名为 HBV_circ_1。HBV 利用其基因组 cccDNA 作为模板转录出 3.5 kb 前基因组 RNA (pgRNA), 以及 2.4 kb, 2.1 kb 和约 0.8 kb 的 mRNA, 比较 HBV pgRNA、3 种 mRNA 与 HBV_circ_1 序列, 我们推测 HBV_circ_1 来源于 HBV 的 pgRNA, 如图 4.2 所示, pgRNA 上 a、b 两个位点通过剪切形成 junction 位点, 而在 pgRNA 转录起始 c, d 和转录终止 e, f 两段序列为单体正向重复序列, 但在 HBV_circ_1 中只保留了其中一个单体正向重复序列, 我们猜测 c, d 和 e, f 两端重复序列可能通过重组方式将序列连接, 最终形成一个 2.5 kb 的 circRNA。

为了验证 HBV_circ_1 的真伪, 根据高通量测序的 HBV_circ_1 全长序列在 HBV 基因组上的位置, 设计发散引物 (divergent primers), 克隆 HBV_circ_1 的环接头 (back-spliced junction) 片段。提取 HepG2.2.15 肝癌细胞株总 RNA, 用 ribo-zero 试剂盒去除核糖体 RNA, 用 RNase R 酶去除线性 RNA, 将回收的 RNA 用随机引物反转录成 cDNA, 用发散引物 primer set# F489 和 R2985 进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖电泳后, 回收目的条带, 克隆进载体后, 进行 Sanger 测序鉴定, 结果显示 HBV 的 HBV_circ_1 的确存在 a、b 两个位点 (图 4.2) 形成的 junction site 序列, 且与高通量测序发现的 HBV_circ_1 的 junction site 序列一致 (图 4.3A), 而在 HepG2 来源的 cDNA 样品中用 F489、R2985 扩增不到特异性的片段, 说明在 HepG2.2.15 细胞中存在 HBV 起源的 circRNA。

为了进一步确认 HBV_circ_1 的存在及真实性, 我们在 HBV_circ_1 的环接头 (back-spliced junction) 处设计了生物素标记的单链 DNA 探针, 利用 Northern blotting 检测经过 RNase R 酶处理过的 HepG2.2.15 细胞 RNA, 成功检测到阳性信号, 说明经 RNase R 酶处理过的 HepG2.2.15 细胞 RNA 中存在 HBV_circ_1 (图 4.3 B)。由于 HBV_circ_1 是在 HBV 阳性的肝癌细胞中发现的, 因此我们进一步用 HBV 的 S 蛋白抗体和 HBV_circ_1 特异性探针检测 HBV 相关的肝癌临床样本, 结果显

示在 HBV 相关肝癌组织芯片中可以检测到明显的 S 蛋白和地高辛信号(图 4.3 C)，而对照组织无，说明 HBV 相关肝癌组织中存在 HBV 编码 HBV_circ_1。经过细胞水平和临床样本检测都能检测到 HBV_circ_1 的存在，说明 HBV_circ_1 确实产生于 HBV 阳性细胞和临床样本中。

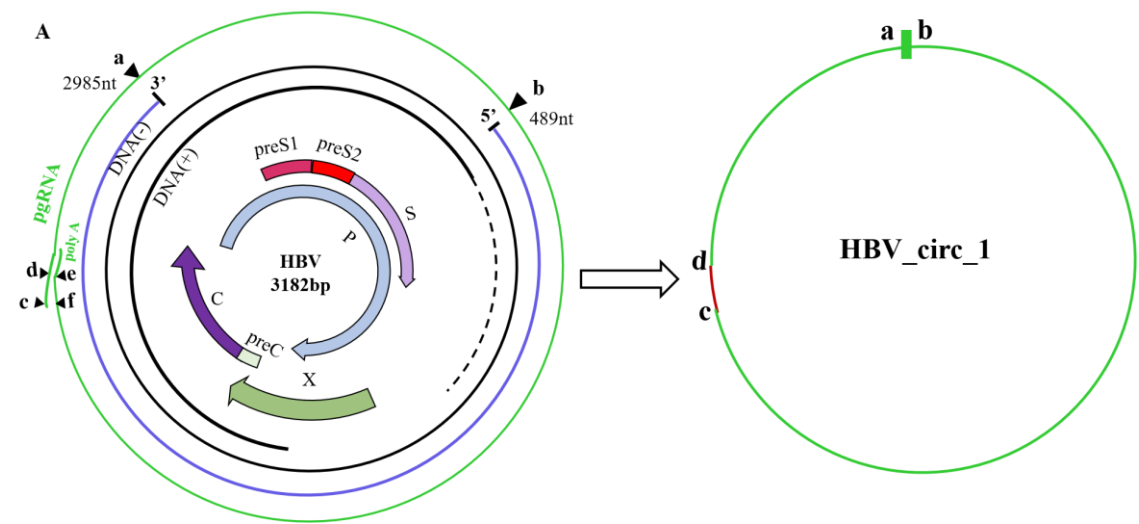


图 4.2 HBV_circ_1 形成机制

A, HBV 基因组及其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 示意图。绿色表示 HBV 转录形成的转录中间体 pre-genomic RNA (pgRNA)。蓝色的线表示 HBV_circ_1 在 HBV 基因组上的位置。B, 由 pgRNA 剪接形成的环状 RNA HBV_circ_1。

Figure 4.2 Formation mechanism of HBV_circ_1

A, The diagram of HBV genome and its open reading frame. Green line represents the transcription intermediate of HBV pre-genomicRNA (pgRNA). Blue line represents the genomic locus of HBV_circ_1 in HBV genome. B, a circRNA HBV_circ_1 derived from pgRNA.

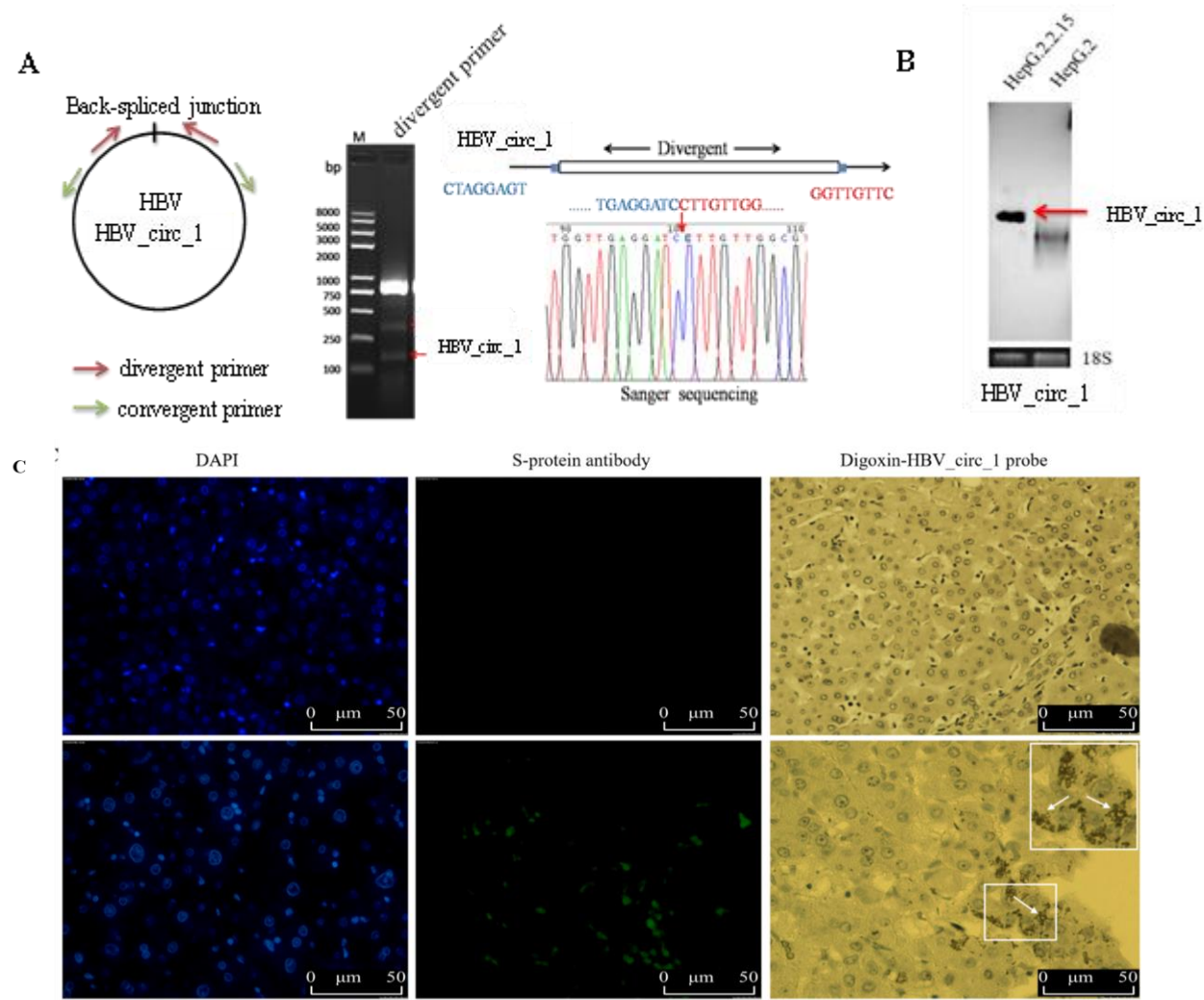


图 4.3 HBV_circ_1 的鉴定。

A, RT-PCR 和 Sanger 测序验证。左图表示鉴定 HBV_circ_1 的引物设计示意图，中间图是 RT-PCR 产物电泳图，右图是 RT-PCR 产物 Sanger 测序。右图中，黑色箭头代表反向引物,用来扩增 HBV_circ_1 反向剪切连接位点,红色箭头表示 Sanger 测序得到的接头位点。B, Northern blotting 验证。C, 原位杂交验证。上排为 HBV 阴性的肝癌组织，下排为 HBV 阳性的肝癌组织。绿色荧光表示 S 蛋白抗体，蓝色表示 DAPI，白色箭头表示地高辛标记的 HBV_circ_1 特异性探针。

Figure 4.3 Validation of HBV_circ_1

A, RT-PCR and Sanger sequencing validation of HBV_circ_1. Left: the diagram of

primer design for identification of HBV_circ_1. Middle: the electrophoresis RT-PCR products. map. Right: Sanger sequencing of RT-PCR products. Black arrows represent divergent primers, which are used to amplify the genome region of HBV_circ_1 containing the backsplice junction site. Red arrow represents the circRNA back-spliced junction site by Sanger sequencing. **B**, Northern blotting validation of HBV_circ_1. 18S represents 18S rRNA, as the internal control. The total RNA per lane was 30 μ g. DNA probes were labeled by biotin, crossing back-spliced junction site. **C**, Validation of HBV_circ_1 in tumor tissue with hybridization in situ. Upper: HBV negative HCC tissue. Lower: HBV positive HCC tissue. Green fluorescence indicates the anti-S-protein polyclonal antibody, blue indicates DAPI, white arrow indicates the Digoxin-probe specific to HBV_circ_1 probe. The first anti-body is rabbit anti-S protein polyclonal antibody (1:1000) and the second is FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200) .

3.2 HBV_circ_1 在肝癌组织中表达水平高于癌旁

为了进一步探究 HBV_circ_1 是否与肝癌关联, 我们在 80 例 HBV 相关肝癌 (HCCT) 和癌旁组织 (HCCPT) 芯片中, 利用原位杂交评估了 HBV_circ_1 在临床样本中的表达水平, 统计结果显示, HBV_circ_1 在肝癌组织中的表达水平显著性地高于癌旁组织 (图 4.4 A, B)。real-time PCR 检测结果显示, HBV_circ_1 在肝癌组织中的表达水平约是癌旁组织的 20 倍 (图 4.4 C)。除此之外我们还发现 HBV_circ_1 阳性的病人其存活率明显低于 HBV_circ_1 阴性的病人 (图 4.4 D) 因此推测 HBV_circ_1 可能参与肝细胞癌的发生或发展进程。

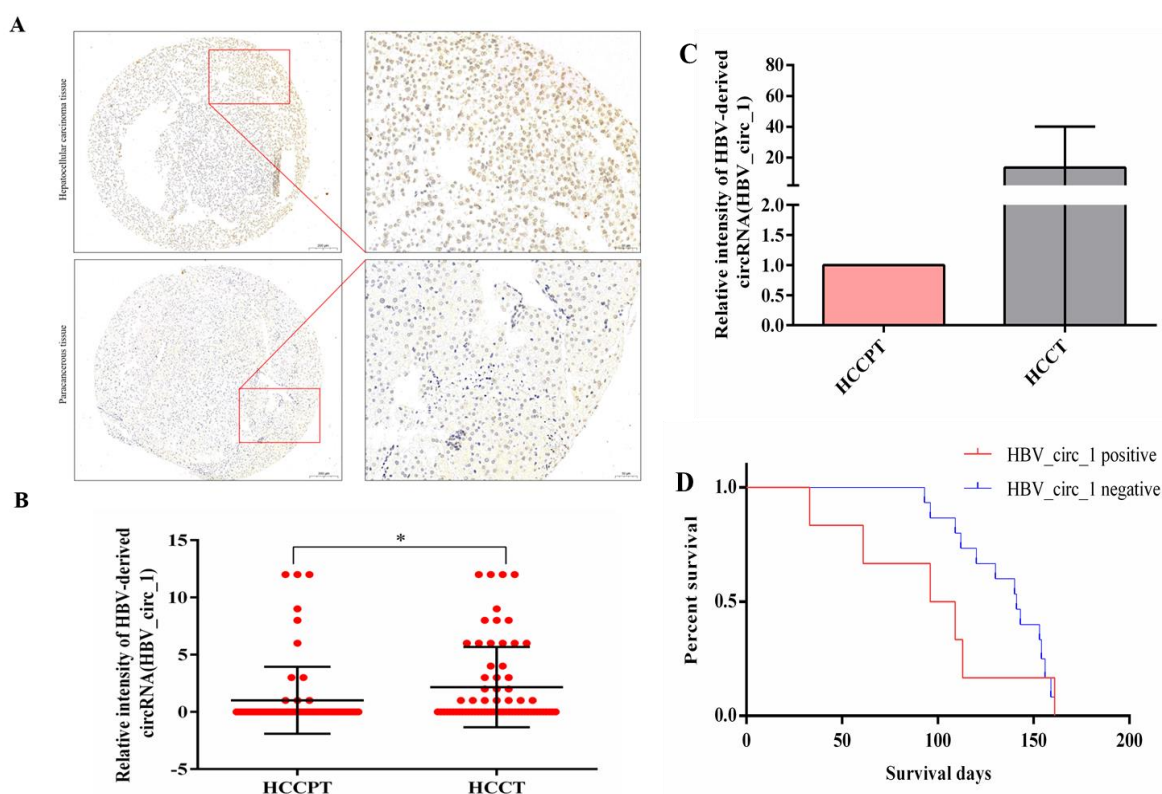


图 4.4 HBV_circ_1 在肝癌组织中表达水平高于癌旁组织

A, 原位杂交检测肝癌和癌旁组织芯片中 HBV_circ_1 的表达水平。**B**, 肝癌 (HCCT) 和癌旁组织 (HCCPT) 芯片中原位杂交结果的统计。**C**, real-time PCR 检测肝癌 (HCCT) 和癌旁临床组织 (HCCPT) 样本中 HBV_circ_1 的表达水平。*代表 P 值 ≤ 0.05 。**D**, HBV_circ_1 阳性表达与癌症患者的存活率相关。

Figure 4.4 The expression level of HBV_circ_1 in HCC tissues is higher than that in paracancerous tissues.

A, The expression of HBV_circ_1 in HCC and paracancerous tissue microarray was detected by in situ hybridization. **B**, Statistics of in situ hybridization results in hepatocellular carcinoma and paracancerous tissue microarray. **C**, Detection of HBV_circ_1 expression in hepatocellular carcinoma and paracancerous clinical tissue samples by real-time PCR. *represents P value ≤ 0.05 . **D**, Positive expression of HBV_circ_1 was correlated with worse overall survival in patients with cancer.

4 讨论

尽管在真核细胞中已发现大量的 circRNA, 但有关病毒是否能形成 circRNA? 相关报道非常少。最新研究报道指出, 属于 DNA 病毒的 EBV 和 KSHV 也能形成 circRNAs。Ungerleider 等人利用 RNase R-sequencing 方法在 I, II, III 三种潜伏类型的 EBV 感染细胞模型中鉴定出 EBV 能编码 circRNAs, 并发现这些 circRNAs 的表达主要取决于 EBV 的转录进程以及相关位点的转录水平, 有细胞模型特异性^[11]。该发现为研究 EBV 编码的 circRNAs 在 EBV 相关疾病中的功能提供了新的线索。Toptan 等人也发现环状 DNA 肿瘤病毒 (EBV 和 KSHV) 能编码环状 RNA, EBV 编码的只含有外显子的 circRNA 更多地分布在细胞质中, 而保留内含子的 circRNA 则出现在细胞核内; 而 KSHV 编码的 circRNA 在细胞质和细胞核中都有分布^[12]。HBV 是属于嗜肝 DNA 病毒科的一种小的 DNA 病毒, 基因组只有 3.2Kb, 能引起急性和慢性肝炎, 并导致肝硬化或肝癌^[13]。尽管存在有效的疫苗, 但 HBV 感染引起的肝癌仍然是一个重大的全球性健康问题。本研究从目前的研究热点 circRNAs 着手, 证明 HBV 能形成 2.5kb 的 circRNAs, 即 HBV_circ_1。HBV 利用其基因组 cccDNA 作为模板转录出 3.5 kb 前基因组 RNA (pgRNA), 以及 2.4 kb, 2.1 kb 和约 0.8 kb 的 mRNA, 其中 pgRNA 可逆转录出基因组 DNA 作为编码病毒核心蛋白和聚合酶蛋白的模板^{[14][15]}, 将 HBV_circ_1 序列与 HBV 的转录本序列进行比较, HBV_circ_1 在序列及大小上与 3 种 mRNA 转录本不同, 因此可以认为 HBV_circ_1 不是起源于 HBV 的 mRNA 转录本。将 HBV_circ_1 序列与 pgRNA 比较, 结合 circRNA 的形成方式, 我们推测 pgRNA 采用图 3.1 所示的方式通过二次剪接形成, 这与来源于 EBV 和 KSHV 的 circRNAs 的形成方式不同。EBV 和 KSHV 编码的 circRNA 均是来源于具有内含子和外显子的转录本^[12], 而 HBV_circ_1 来自于转录中间体 pgRNA。

越来越多证据表明 circRNAs 在 HCC 组织和正常组织中有不同程度的表达, 并且 circRNAs 的差异表达与其功能、HCC 临床病理和预后都有密切关系。如 Cul2 circRNA^[16], circHIPK3^[17], hsa_circ_0016788^[18]等在 HCC 组织中表达水平高于正常组织, 且都是细胞增殖、迁移及侵袭的正调控因子。hsa_circ_0016788 还是细胞凋亡的负调控因子。相反, circSMAD2^[19], circC3P1^[20], cSMARCA5^[21], 等在 HCC 组织中表达水平下调, 他们都能抑制细胞增殖、迁移及侵袭, cSMARCA5 和

circMTO1^[22]还能促进细胞凋亡。在本研究中, HBV 相关肝癌组织芯片原位杂交和临床组织样本的检测结果都显示 HBV_circ_1 在肝癌组织中的表达水平显著性地高于癌旁组织,暗示 HBV_circ_1 可能同在 HCC 组织中高表达的细胞 circRNAs 一样是细胞增殖、迁移、侵袭的正调控因子,参与肝细胞癌的发生或发展进程,这为我们后续研究 HBV 的生物学功能提供了方向。

目前有关病毒形成 circRNA 的报道非常少,而病毒形成的 circRNA 是否具有生物学功能?在临床上是否具有意义?没有报道。据我们所知,本研究是第一次在临床组织样本中发现 HBV 能编码 circRNA,因此后续研究 HBV_circ_1 的功能及作用机制有可能为病毒的分子生物学、病毒的致病机制开辟新的领域,具有重要的临床意义。病毒 circRNA 可以作为 RNA 生物学研究的重要模型系统,因为它们是从基因组小而且遗传背景明确的病毒基因组中表达出来的,这些 circRNA 在病毒基因组的背景下更容易被操纵。如果发现 HBV_circ_1 真的有助于肿瘤的发生,那么它们就可能成为比目前治疗方法更有靶向性、毒性更小的治疗靶点。另外,HBV_circ_1 在 HBV 相关的癌与癌旁组织中表达水平的差异性是否预示着它可以作为 HBV 相关肝癌诊断的潜在生物标志。目前对 HBV 病毒活跃程度主要依赖于乙肝两对半及病毒 DNA 的检测,病毒 RNA 可能更能代表宿主体内的病毒活跃程度,因为它是病毒借助宿主系统转录形成的。然而,线性 RNA 结构不稳定容易被降解,这为检测带来了不便。circRNA 具有闭合环状结构,难以被 RNA 外切酶降解,稳定性高,因此 HBV_circ_1 可能作为 HBV 感染的诊断标志。

参考文献

- [1] Lyu D, Huang S . The emerging role and clinical implication of human exonic circular RNA[J]. RNA Biology, 2016:00-00.
- [2] Wang L, Tong X, Zhou Z, et al. Circular RNA hsa_circ_0008305 (circPTK2) inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis by controlling TIF1 γ in non-small cell lung cancer[J]. Molecular Cancer.2018.
- [3] Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs[J]. Virology, 2011, 411:325-343.
- [4] Rosa M D , Gottlieb E , Lerner M R , et al. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the

- adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII.[J]. Molecular and Cellular Biology, 1981, 1(9):785-796.
- [5] Schwemmle M, Clemens M J, Hilse K, et al. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(21):10292-10296.
- [6] Inturi R, Kamel W, Akusjärvi G, et al. Complementation of the human adenovirus type 5 VA RNAI defect by the Vaccinia virus E3L protein and serotype-specific VA RNAs.[J]. Virology, 2015, 485:25-35.
- [7] Sullivan C S , Grundhoff A T , Tevethia S , et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells[J]. Nature (London), 2005, 435(7042):682-686.
- [8] Gottwein E, Cullen B R. A human herpesvirus microRNA inhibits p21 expression and attenuates p21-mediated cell cycle arrest. [J]. Journal of Virology, 2010, 84(10):5229-5237.
- [9] Abend J R, Uldrick T, Ziegelbauer J M. Regulation of Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Receptor Protein (TWEAKR) Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNA Prevents TWEAK-Induced Apoptosis and Inflammatory Cytokine Expression[J]. Journal of Virology, 2010, 84(23):12139-12151.
- [10] Rossetto C C , Tarrant-Elorza M , Verma S , et al. Regulation of Viral and Cellular Gene Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Polyadenylated Nuclear RNA[J]. Journal of Virology, 2013, 87(10):5540-5553.
- [11] Ungerleider N, Concha M, Lin Z, et al. The Epstein Barr virus circRNAome[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(8): e1007206.
- [12] Toptan T, Abere B, Nalesnik MA, et al. Circular DNA tumor viruses make circular RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(37): E8737-E8745.
- [13] Franco E, Bagnato B, Marino MG, et al. Hepatitis B: epidemiology and prevention in developing countries[J]. World J. Hepatol, 2012, 4: 74–80.
- [14] Ohno M , Otsuka M , Kishikawa T , et al. Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(23):7084-7088.
- [15] Ko C, Chakraborty A, Chou WM, et al. Hepatitis B virus genome recycling and de

- novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels[J]. J Hepatol, 2018, 69: 1231-1241.
- [16] Meng J, Chen S, Han J, et al. Twist1 regulates vimentin through cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2018, 78(15):4150-4162.
- [17] Chen G, Shi Y, Liu M, et al. circHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(2):175.
- [18] Guan Z, Tan J, Gao W, et al. Circular RNA hsa_circ_0016788 regulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis through miR-486/CDK4 pathway[J]. Journal of cellular physiology, 2018.
- [19] Zhang X, Luo P, Jing W, et al. circSMAD2 inhibits the epithelial–mesenchymal transition by targeting miR-629 in hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther. 2018, 11: 2853–2863.
- [20] Zhong L, Wang Y, Cheng Y, et al. Circular RNA circC3P1 suppresses hepatocellular carcinoma growth and metastasis through miR-4641/PCK1 pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018 499: 1044–1049.
- [21] Yu J, Xu Q, Wang Z, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology, 2018, 68(6):1214–1227.
- [22] Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. Hepatology, 2017, 66(4):1151–1164.

第五章 HBV_circ_1 生物学功能及其分子机制探究

摘要：为了探讨 HBV_circ_1 的功能，利用流式细胞术研究了 HBV_circ_1 对肝癌细胞表型特征的影响，结果显示，HBV_circ_1 促进 HepG2 细胞的增殖、细胞周期进程、细胞迁移，抑制肝癌细胞凋亡。RNA pull-down 和双荧光素酶基因报告系统实验显示，HBV_circ_1 能与 hsa-miRNA-6124 互作调节 ST7 (Suppression of tumorigenicity 7, GenBank: AK297510.1) 表达，推测肝癌的发生和/或发展受到 HBV_circ_1-hsa-miRNA-6124-ST7 网络的调节。RNA pull-down、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RIP) 结合质谱分析对 HBV_circ_1 的结合蛋白进行了鉴定，发现 HBV_circ_1 能与周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases 1, CDK1)、真核翻译延伸因子 (Elongation factor 1-alpha 1, EEF1A1) 等多种蛋白互作。细胞免疫荧光及 Western blotting 进一步证实，HBV_circ_1 能与 CDK1、EEF1A 互作，暗示 HBV_circ_1 有可能通过与蛋白互作调节肝癌细胞的表型特征。此外，我们还发现 HBV_circ_1 可促进 HBV 复制提高细胞 CDK1 蛋白水平。表明 HBV 能形成功能性 circRNA，HBV_circ_1 在 HBV 相关肝癌发生、发展方面扮演重要角色，HBV_circ_1 还有可能成为治疗 HBV 患者的分子靶点。

关键词：HBV; HBV_circ_1; ST7; CDK1; EEF1A; HepG 2

1 前言

目前，CircRNAs 的生物学功能主要涉及 5 方面：充当 miRNA 海绵体以抑制其功能，充当转录和翻译调节器调控因子从而调控亲本基因的表达，影响 pre-mRNAs 的选择性剪接，与蛋白质结合从而抑制蛋白活性、募集蛋白质复合体的组分或调控蛋白质的活性，作为翻译模板指导蛋白质合成^[1]。充当 miRNA 或者蛋白的海绵体是 circRNA 最经典的生物学功能。miRNAs 是一种基因表达调控因子，它能够通过直接结合 mRNAs 导致 mRNA 翻译的终止或降解^[2]。circRNAs 中含有 miRNA 结合位点，证明它可以和 mRNA 竞争性地与 miRNA 结合。人小脑变性相关蛋白 1 转录本 (cdr1as 或 ciRS-7) 含有 70 多个保守的 miR-7 结合位点^[3]。CDR1as

与 miR-7 结合有利于 miR-7 和 Ago 2 蛋白特异性相互,从而阻止 miR-7 与靶 mRNA 的结合。来源于性别决定区域 Y (Sry) 的 circRNAs 包含了 16 个 miR-138 的结合位点^[4]。人细胞中 circHIPK3 能吸附 miR-124 从而调控细胞生长^[5]。沉默 circHIPK3 而 HIPK3 mRNA 表达水平不发生改变的情况下细胞生长被显著抑制。双荧光素酶报告系统实验证明了 circHIPK3 可以吸附 9 种 miRNAs, 并且还包含 18 个可能的 miRNA 结合位点。其中, circHIPK3 直接与 miR-124 结合, 抑制 miR-124 活性。CircRNAs 除了作为 miRNA 海绵体外, 它还能作为蛋白海绵体。circRNAs 能与蛋白质结合, 改变蛋白亚细胞定位、调节蛋白活性、改变募集蛋白质复合体的组分。例如 circ-foxo3 在肺癌细胞中高表达并且与细胞周期进程相关^[6]。沉默内源性 circ-foxo3 能够促进细胞增殖, 而异位高表达 circ-foxo3 则细胞周期进程受到抑制。circ-foxo3 能与细胞周期蛋白依赖性细胞周期蛋白激酶 2 (也被称为细胞分裂蛋白激酶 2, CDK2) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 (p21) 结合, 从而形成 circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物。通常, CDK2 能与细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 E 结合进而促进细胞周期进程, 而一旦 p21 激活则会抑制 CDK2 与周期蛋白的结合从而阻止细胞周期进程^[7], circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物的形成遏制了 CDK2 的功能, 从而阻断了细胞周期进程。此外, circ-Amotl 1 能与 c-myc、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)、PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1) 及 AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1) 结合促进其易位进入细胞核, 从而调节靶基因的表达^[8]。

尽管已在真核细胞中发现大量的 circRNA, 但真正探明其功能的却非常有限, 已有研究研究表明细胞的 circRNAs 参与了多种疾病的发生发展^[9]。然而, 至今仍无关于病毒 circRNAs 功能的报道。为了理解 HBV_circ_1 的功能和作用机制, 在研究 HBV_circ_1 对肝癌细胞表型特征影响的基础上, 基于 circRNA 可以作为 miRNAs 及蛋白的“海绵体”, 我们对 HBV_circ_1 的互作 miRNA 及蛋白进行了鉴定, 期望为 HBV 相关的肝癌治疗药物开发提供靶点。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 载体质粒

pLCDH-ciR 载体为广东吉赛公司产品，pmirGLO 荧光素载体，海肾荧光素质粒 pRL-TK 为 Promega 公司产品。

2.1.2 试剂

Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司，生物素标记的 NTP 为罗氏公司的产品，DNA Taq 聚合酶为 Fermentas 公司产品，DNA 胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品，DNA 标准分子量 Marker 为北京全式金公司产品，RNAiso Plus 试剂购自 TaKaRa 公司。反转录试剂盒及 real-time PCR 检测试剂盒均购自北京全式金公司，DNase I、T4 DNA 连接酶、RNA pull-down(蛋白)试剂盒购自 Thermo fisher 公司，Ribonuclease R (RNase R) 购自 Epicentre 公司，双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。CFSE 染料购自 Thermo fisher 公司，细胞周期检测试剂盒 (PI 法) 购自碧云天，细胞凋亡检测试剂盒 (Annexin V-PE/7-AA) 购自博奥龙，细胞迁移小室为 Costar 公司产品。CDK1 抗体购自武汉谷歌生物。EEF1A1, PHB, U2AF35 抗体，CY3 标记的链霉素购自 GenTex 公司。

2.2 HBV_circ_1 过表达载体构建

为了构建 HBV_circ_1 过表达细胞株，通过引物 pLCDH-HBV_circ_F/pLCDH-HBV_circ_R (表 5.1) 扩增 HBV_circ_1 的全长序列，尔后亚克隆到环状 RNA 过表达载体 pLCDH-ciR 的 *EcoRI* /*Bam*HI 获重组质粒 pLCDH-HBV_circ_1 (图 5.1A)。为了验证该载体在体内形成 HBV_circ_1 的能力，分别用 0.5μg 和 1μg pLCDH-HBV_circ_1 质粒转染 HepG 2 细胞，48h 后收集细胞提取 RNA, 通过 RT-PCR, Sanger 测序验证载体成环的准确性，并通过 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 的表达水平。RT-PCR 和 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 所用引物相同，见表 5.1。

表 5.1 成环载体构建及验证 HBV_circ_1 所需引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
pLCDH-HBV_circ	GAATTCTGAAATATGCTATCTTACAGGA TCCTCA ACAACCAGCACG	GGATCCTCAAGAAAAAATATATT CACCTTGTTGGCGTCTGGCCAGG
HBV_circ_1	TTGAGCAGTAGTCATGCAGG	GATTCTTTCCCGACCACC
β -actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTACCGTTCC

2.3 体外构建 HBV_circ_1

首先用 T7-HBV_circ_1 上下游引物（表 5.2）通过 PCR 扩增获得带有 T7 启动子的 HBV_circ_1 的线性全长序列，并以此 DNA 作为体外转录的模板，T7 体外转录体系如下：

10×T7 RNA Polymerase Buffer	2 μ L
50 mM DTT	2 μ L
ATP, CTP, GTP, UTP each	2 mM
RNase Inhibitor	20 units
Template DNA	20 ng-1 μ g
T7 RNA Polymerase	50 units
DEPC 水补到	20 μ L

37°C反应 2-3 h。反应结束后，加入 2 μ L DNase I 酶消化 DNA 模板，之后再通过酚、氯仿纯化 RNA。然后将纯化的 RNA 通过 T4 RNA Ligase 连接成环，连接成环体系如下：

10 × Reaction Buffer	2 μ L
RNA	50-100 pmol
T4 RNA Ligase	1 μ L
Rnase inhibitor	0.5 μ L
10% PEG8000	4 μ L
DEPC 水补到	20 μ L

25°C反应 2 h，或者 16°C反应过夜，然后用 RNase R 酶消化未成环的线性 RNA，消化体系如下：

RNA	15 μ g
RNase R	1 μ l (15 U)
10 × Reaction Buffer	2 μ L
DEPC 水补到	20 μ L

37°C反应 20 min，然后通过酚、氯仿纯化 RNA。用同样的方法制备 circ_gfp 作为对照。制备生物素标记的 circRNA 时，将体外转录体系中反应体系中的 NTP 改为生物素标记的 NTP。

表 5.2 体外成环所需引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
T7-circ_gfp	TAATACGACTCACTATAGGCAAGCTGAC CCTGAAGTTC	GTAGTTGTACTCCAGCTTGTG
T7-HBV_circ_1	TAATACGACTCACTATAGGGATCCTCAA C AACCAGCACG	CTTGTTGGCGTCTGGCCAGG

2.4 细胞表型特征检测

2.4.1 细胞增殖检测

- 1) CFSE 配制：用 DMSO 配制浓度为 5 M 的 CFSE 储存液，待用时用无血清高糖培养基将其稀释成 5 μM 工作液。
- 2) 1×10⁵ HepG 2 细胞培养 24 h，然后转染 40 pmol 体外转录法构建的 HBV_circ_1 和 circ_gfp， 24 h 后进行 CFSE 染色。
- 3) CFSE 染色：细胞经胰酶消化后，用 500 μL 无血清培养基重悬细胞，加入等体积的 CFSE 工作液，37℃避光孵育 10 min。（孵育过程中每隔几分钟要混匀培养）。
- 4) 用预冷的胎牛血清终止 CFSE 染色，终止比例为染色混合液：血清=2：1，加入预冷的血清后室温静置 5 min，离心弃上清。
- 5) 用培养基洗涤细胞，3000 × g 离心 5 min，细胞加入完全培养基培养 24 h 后流式细胞检测仪（CoulterFC500，美国 Beckman）检测细胞增殖。

2.4.2 细胞周期检测

- 1) 细胞样品的准备：用胰酶消化贴壁细胞，1000× g 离心 3-5 min，沉淀细胞。小心吸除上清，为避免吸走细胞，可以残留约 50μL 左右的培养液。用约 1ml 预冷的 1×PBS 重悬细胞，并转移至 1.5ml 离心管内。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50μL 左右的培养液。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞，避免细胞成团。
- 2) 细胞固定： 将细胞加入到 1ml 预冷的 70%乙醇中， 轻轻吹打混匀， 4℃ 固定 2 h 或更长时间。固定 12-24 h 可能效果更佳。1000× g 离心 3-5 min，沉淀细胞。小心吸除上清，残留约 50μL 左右 70%乙醇为避免吸走细胞。加入约 1ml 预冷的 PBS，重悬细胞。再次离心沉淀细胞，小心吸除上清，可以残留约 50μL 左右的 PBS。轻轻弹击离心管底以适当分散细胞，避免细胞成团。

3) 染色: 每管细胞样品中加入 0.5 ml 碘化丙啶染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37°C 避光温浴 30min。

4) 流式检测和分析: 用流式细胞仪在激发波长 488nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。

2.4.3 细胞凋亡检测

1) 用 ddH₂O 按 1:4 稀释结合缓冲液 (4ml 结合缓冲液+12ml 去离子水)。

2) 用 4°C 预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 用 250μl 结合缓冲液重悬细胞, 调节其浓度为 1×10⁶/ml;

3) 取 100μl 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5μL Annexin V/PE, 室温避光孵育 5 min。

4) 向细胞悬液中加入 10μL 7-AAD 溶液;

5) 在反应管中加 400μL PBS, 流式细胞仪 (FACS) 分析。

2.3.4 细胞迁移检测

1) 将 BD 公司的 Matrigel 稀释 8 倍, 吸取 50 μL 铺于 Transwell 小室的上室膜上, 然后于 37°C 放置半 h 使 Matrigel 形成凝胶。

2) 细胞用胰酶消化, 制备细胞悬液, 使细胞密度为 1×10⁵/ml, 向 Transwell 小室的上室加入 100 μL 细胞悬液, 下室加入 600μL 含 10% FBS 的培养基。

3) 培养 24hh 后, 弃去上室液体, 小心取出上室, 用湿棉签擦去膜上未穿过膜的细胞。

4) 4%中性甲醛固定 10 min 后, 用萨姆染料进行染色, 水洗, 干燥, 取下微孔滤膜, 倒置显微镜下直接观察穿过膜的细胞。

2.5 RNA pull-down (筛选互作 miRNA)

2.5.1 相关试剂配制

1) 多核糖体裂解液

KCl	0.37275 g
Tris-HCl	0.1576 g
MgCl ₂	0.050825 g
NP-40	250 μL
DEPC 水配制定容至 50 ml, 调 pH 至 7.5	

2) TENT 缓冲液

NaCl	0.7305 g
Tris-HCl	0.0788 g
EDTA	0.0146 g
Triton-100	250 μL
DEPC 水配制定容至 50 ml, 调 pH 至 8.0	

2.5.2 实验步骤

1) 收集 1×10^6 的 HepG 2.2.15 细胞, 用 1 ml 预冷的 $1 \times$ PBS 离心洗涤细胞 2 次 (每次 $1000 \times g$, 4°C 离心 5 min), 然后向细胞中加入 500 μL 的多核糖体裂解液 (使用前需加入 100 U/ml RNAase 抑制剂和蛋白酶抑制剂) 轻轻吹散细胞, 在冰上裂解 10 min。

2) 细胞裂解液 $12000 \times g$, 4°C 离心 10 min, 收集上清备用。

3) 取 150 μL 细胞裂解液上清, 加入 200 pmol 生物素标记的探针 (与 Northern blotting 时所用的探针序列一致), 然后再加入 100 μL TENT 缓冲液, 室温旋转混匀 1 h。

4) 充分重悬链霉素琼脂, 取 50 μL 至 1.5 ml 离心管中, 用 TENT 缓冲液轻洗琼脂, $1000 \times g$, 4°C 离心 5 min 收集琼脂, 将裂解液与链霉素琼脂充分混匀, 室温孵育 30 min。

5) 短暂离心将复合物离心至管底, 弃上清。

6) 向沉淀中加入 1 ml TENT 缓冲液洗涤, $1000 \times g$, 4°C 离心 5 min, 弃上清, 重复 5 次。

7) 向沉淀复合物中加入 RNAiso Plus 提取 RNA, 利用 miRNA 反转录引物 Has-miR-6124-RT 进行反转录 (步骤同前), 然后通过 real-time PCR 检测 miRNA 富集水平, 反转录引物和定量引物见表 5.3。

表 5.3 miRNA 反转录和 PCR 引物

Primer Name	Sequence (5'→3')
Has-miR-6124-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCCTCCC
Has-miR-6124-F	GCGCGGGGAAAAGGAAGG
Has-miR-6124-R	ACCTCGGACCCTGCAC

2.6 双荧光素酶载体构建及荧光素酶活性检测

2.6.1 构建荧光素酶报告基因载体

为了进一步验证 HBV_circ_1 与 has-miR-6124 的直接相互作用,我们构建了双荧光素酶报告载体。首先通过软件 RNAhybrid 2.2 (<https://omictools.com/rnahybrid-tool>) 预测 has-miR-6124 与 HBV_circ_1 的结合位点以及 ST7 基因 3'UTR 的结合位点,根据预测结果设计引物 HBV-miR-6124-Forward/HBV-miR-6124-Reverse 以及引物 ST7-3'UTR-Forward/ST7-3'UTR-Reverse,分别用于扩增 has-miR-6124 在 HBV_circ_1 上的结合位点(1179—1378nt)序列以及 ST7 基因 3'UTR 上的结合位点(GenBank: AK297510.1, 1811—2030nt)的序列,扩增的 DNA 片段用 Sac I 和 Xba I 酶切后,分别亚克隆进载体 pmirGLO。构建的重组质粒结构如图 5.5 所示。

表 5.4 构建荧光素酶报告基因载体所需引物

Genes Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
HBV-miR-6124	GAGCTCTGATTAGGCAGAGGT	CCAAGGTCTTACATATCTAGA
ST7-3'UTR	AACTTTGTCATGGAGAAAGT	ACAGCTTTTAATATGGAATA

2.6.1 荧光素酶活性检测

HepG 2 细胞以 1×10^5 /孔接种在 24 孔板中培养 24 h,将 0.4 μg 的重组 pmirGLO 质粒, 0.04 μg 海肾荧光素酶质粒 pRL-TK 以及 2 μmol miRNA 模拟体通过 Lipofectamine 3000 介导共转染进 HepG 2 细胞。培养 60hh,用 1 $\times$ PBS 洗细胞 2 次,然后在每孔细胞中加入 1001 $\times\mu\text{L}$ 细胞裂解液(试剂盒中 5 $\times$ 细胞裂解液用 ddH₂O 稀释至 1 $\times$),室温裂解 15min 后,收集细胞裂解液,离心取上清,Nanodrop2000 测定蛋白浓度。按试剂盒说明书配制萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶发光底物,100 μg 的蛋白样品用多功能检测仪(GloMax Muti Jr,德国 Promega)在 465nm 波长下测定荧光值。最后计算相对荧光素酶活性,即萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性的值。同设碱基随机排列模拟体 Mimics-NC 对照。miRNA 模拟体由上海艾博思公司合成,序列见表 5.5。

表 5.5 miRNA 模拟体序列

Genes Name	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
Has-miR-6124 mimics	GGGAAAAGGAAGGGGAGGA	CUCCCCCUUCCUUUUCUU
Mimics-NC	UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA	UACUCUUUCUAGGAGGUUGUGAUU

2.7 siRNA 干扰沉默 HBV_circ_1 表达

为了在 HepG2.2.15 细胞中敲低 HBV_circ_1 的水平，根据 HBV_circ_1 的 back-spliced junction 位点设计了 3 条 siRNAs 以及碱基随机排列 siRNA-NC（阴性对照）。siRNA 由上海艾博思公司合成，序列见表 5.6。

表 5.6 siRNA 序列

Genes Name	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
siRNA-1	CAACAAGGAUCCUCAACAAuu	UUGUUGAGGAUCCUUGUUGgc
siRNA-2	AGACGCCAACAAGGAUCCUuu	AGGAUCCUUGUUGGCGUCUgg
siRNA-3	ACGCAACAAGGAUCCUCAuu	UGAGGAUCCUUGUUGGCGUcu
NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

2.8 RNA pull-down 筛选 circRNA 互作蛋白

1) 收集细胞，制备细胞裂解液：收集 1×10^6 的 HepG 2 细胞，用 1 ml 预冷的 $1 \times \text{PBS}$ 离心洗涤细胞 2 次（每次 $1000 \times g$ ， 4°C 离心 5 min），然后向细胞中加入 500 μL 试剂盒中的细胞裂解液，轻轻吹散细胞，在冰上裂解 10 min， $12000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min，收集上清，Nanodrop2000 测定浓度后备用。

2) 磁珠预处理：小心重悬磁珠，吸取 40 μL 磁珠至 1.5 ml nuclease-free 离心管中，然后将离心管置于磁力架上收集磁珠，用 2 倍体积的 0.1 MNaOH 洗磁珠 2 次，50 mMNaCl 洗 1 次，100 mM 生理盐水洗 1 次。

3) 生物素标记的 RNA 与链霉素磁珠结合

- ① 将离心管置于磁力架上，待磁珠沉入底部，弃上清。
- ② 用等体积的 20mM Tris（pH 7.5）混匀重悬磁珠。
- ③ 重复步骤①-②。

- ④ 将离心管置于磁力架上收集磁珠，弃上清。
- ⑤ 加入等体积的 1×RNA 捕获缓冲液，轻轻重悬磁珠。
- ⑥ 向磁珠中加入 40 pmol 生物素标记的 RNA，轻轻混匀。
- ⑦ 室温搅动孵育 15 – 30min （此时调 4℃ 培养箱，并且稀释 10× RNA-蛋白结合液至 1×）

4) RNA 与蛋白结合

- ① 将离心管置于磁力架，收集磁珠，弃上清。
- ② 加入等体积 20mM Tris （pH 7.5），轻轻混匀重悬磁珠。
- ③ 重复步骤①-②。
- ④ 重复①。
- ⑥ 向磁珠中加入 100 uL 1×RNA-蛋白结合液，轻轻混匀后将离心管置于磁力架上收集磁珠，弃上清。

⑦ RNA-蛋白结合体系如下

10× Protein-RNA Binding Buffer	10 uL
50% glycerol	30 uL
Lysate (>2 mg/mL)	30 uL
DEPC water 补至	100 uL

- ⑧ 向磁珠中加入上述步骤中 100 uL 反应混合液，轻轻混匀，4℃ 搅拌孵育 30-60 min。

5) RNA-蛋白结合复合物洗脱

- ① 将离心管置于磁力架，收集磁珠，弃上清。
- ② 向磁珠中加入 100 uL 1× 洗脱缓冲液。
- ③ 重复 2 次步骤①和②。
- ④ 重复步骤①。
- ⑤ 加入蛋白上样缓冲液 50 uL，95℃ 加热 5 min，待做 SDS-PAGE 电泳分析

2.7 银染与质谱鉴定：

- 1) 固定：将凝胶放置于固定液中，摇床孵育 30 min；
- 2) 敏化：凝胶放置于敏化液中，孵育 30 min；
- 3) 50 mL 去离子水清洗凝胶，洗 3 次，每次 5 min。（清洗凝胶的同时配制硝

酸盐溶液、显色液和终止液待用)；

4) 加入 50 mL 硝酸盐溶液，避光摇床震动 3 min，加入去离子水漂洗 1 min；

5) 加入 50 mL 显色液（本步需密切观察颜色变化），待出现较明显的蛋白条带时，取出凝胶加入至终止液中，摇床震动 10 min，凝胶置于 4℃ 保存。

6) 回收差异条带，委托上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定。

2.9 蛋白与 HBV_circ_1 在细胞中的共定位免疫荧光

HepG 2 细胞以 1×10^4 接种在 24 孔板中培养 24hh，然后分别向细胞中转染 35 pmol 生物素标记的 HBV_circ_1，生物素标记的线性化 HBV_circ_1 及生物素标记的 circ_gfp，其中转染线性化 HBV_circ_1 及 circ_gfp 作为对照。培养 48hh 后，收集细胞进行免疫荧光检测，具体步骤如下：

1) 收集的细胞用 1×PBS 3 次，然后用 4% 的多聚甲醛固定 10 min；

2) PBST 洗 3 次，每次 5 min，然后加入 0.1% Triton-100，避光孵育 5 min；

3) PBST 洗 3 次，每次 5 min，然后加入 5% BSA 室温封闭 2 h 及以上；

4) 加入由 5% BSA 稀释的 CDK1 抗体 (1:400) 或者 EEF1A1 抗体 (1: 400)，室温避光孵育 2h；

5) PBST 洗 3 次，每次 10 min，然后加入用 5% BSA 稀释的 CY3 标记的生物素抗体 (1: 3000) 和 FITC 标记的羊抗兔二抗 (FITC 标记, 1:300)，室温避光孵育 1 h；

6) PBST 洗 3 次，每次 10 min，然后加入用 PBST 稀释的 DAPI (1:10000)，避光孵育 5 min；

7) PBST 洗 3 次，每次 5 min，。将细胞爬片取出晾干，滴加 10 μL 防淬灭剂封片，荧光正置显微镜 (Leicadm2000 led, 德国莱卡) 观察荧光。

2.10 RIP (RNA Immunoprecipitation) 实验

2.10.1 相关试剂配制

1) 10×细胞裂解缓冲液

KCl	1 M
NP-40	5%
MgCl ₂	50 mM
HEPES-NaOH, pH 7	100 mM

2) 5× NT-2 缓冲液

NaCl	750 mM
Tris-HCl (pH 7.4)	250 mM
MgCl ₂	5 mM
NP40	0.25%

使用前, NT-2 缓冲液前需稀释成 1×, 并添加 EDTA (pH 8.0), DTT, RNAase 抑制剂和蛋白酶抑制剂至终浓度分别为 20 mM, 1mM, 100 U/ml。

2.10.2 RIP 实验

1) 细胞收集与裂解: 用胰酶消化细胞, 将细胞收集在预冷的 1×PBS 中 (例如: 10⁷ 细胞加入 2 ml PBS), 洗涤细胞 2 次, 每次 1000 ×g, 4℃离心 5 min, 然后向细胞中加入等体积的细胞裂解液, 轻轻吹散细胞, 在冰上裂解 20 min。细胞裂解液 12000 ×g, 4℃离心 10 min, 收集上清备用。

2) 琼脂糖珠与抗体准备: protein-A/G 包被的琼脂糖珠充分重悬后, 取 50 μL 至 1.5 ml 离心管中→NT-2 缓冲液洗涤 2 次→加 100 μL NT-2 缓冲液重悬珠子, 加 2 μg 目标抗体 (CDK1 兔抗/EEF1A1 兔抗/PHB 兔抗/U2AF35 兔抗), 室温混匀 1 h →5000 ×g, 4℃离心 1 min, 弃上清→加入 1 ml NT-2 缓冲液轻轻吹打混匀, 5000 ×g, 4℃离心 1 min, 弃上清, 重复 5 次→加入 900 μL NT-2 缓冲液重悬珠子, 冰浴备用。

3) 取 100 μL 的细胞裂解液加入到 900 μL NT-2 缓冲液重悬珠子中, 4℃孵育过夜。

4) 短暂离心将复合物离心至管底, 弃上清。

5) 向沉淀中加入 1 ml NT-2 缓冲液洗涤, 1000 ×g, 4℃离心 5 min, 弃上清, 重复 5 次。

6) 向沉淀复合物中加入 RNAiso Plus 提取 RNA, RNA 提取以及反转录步骤同前, 然后通过 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 富集水平。

2.11 Western blotting

1) 转膜: 本实验采用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 湿转方式。

① 将凝胶切成所需大小用于转印。

② 剪取和凝胶相同大小的 PVDF 膜和吸水纸 (Whatman 3MM)。

- ③ 将 PVDF 膜浸入甲醇中活化 5~10 min，将吸水纸放入湿转缓冲液中浸湿。
- ④ 将吸水纸、凝胶、PVDF 膜、吸水纸依次叠放于转膜的负极，赶走各层间的小气泡。加转膜缓冲液，保证其完全浸润。
- ⑤ 盖上负极及顶盖，接通电源，在 100V 电压下转膜 1h，取出 PVDF 膜。
- 2) 封闭：用 PBST 漂洗印迹膜数次去除甲醇，加入适量的 3 % BSA/ PBST，密封， 4℃孵育过夜。
- 3) 一抗包被：从封闭缓冲液中取出印迹膜， PBST 清洗印迹膜 3 次，每次 10min，加入一抗溶液振荡孵育 2 h。（3 % BSA/ PBST 稀释一抗至 1:1000，CDK1 兔多抗或 EEF1A1 兔多抗），
- 4)二抗包被: 从一抗缓冲液中取出印迹膜用 PBST 清洗印迹膜 3 次，每次 5min，加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗溶液（稀释比例为 1： 10000），振荡孵育 1h。
- 5) 显色：配制 ECL 显色液（避光），将 A 液和 B 液等量混匀，将显色液均匀的覆盖在膜表面，然后用一块干净的保鲜袋覆盖在膜上，注意不能有气泡，然后用型号为 Clinx ChemiScope 6300 化学发光仪进行曝光。

2.12 Real-time PCR 检测 ST7、HBV P 基因表达水平

RNA 提取，反转录以及 real-time PCR 体系和程序设定同第三章。定量引物见表 5.7，β-actin 为内参。

表 5.7 Real-time PCR 引物

Genes Name	Forward primers （5'→3'）	Reverse primers （5'→3'）
ST7	ATTAACACCGAAGTTCTACGTGG	TGAATGAAGTTCCGTATTTGCGA
HBV P 基因	ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAT	CAGAACAGGGTTTACTGTTTCCTG
β -actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC

2.13 数据分析统计

采用 GrapPad Prism 6 软件对数据统计分析，*代表 P 值 ≤ 0.05 ，**代表 P 值 ≤ 0.01 ，***代表 P 值 ≤ 0.001 。

3 结果与分析

3.1 体外转录法构建的 HBV_circ_1 及 HBV_circ_1 表达载体鉴定

为了研究 HBV_circ_1 在肝细胞癌中的功能,我们设计和构建了在哺乳动物细胞中表达 HBV_circ_1 的真核表达载体 pLCDH-HBV_circ_1,构建示意图如图 5.1A 所示。RT-PCR 及 Sanger 测序结果显示 pLCDH-HBV_circ_1 载体在细胞内形成的 HBV_circ_1 的 junction site 的旁侧序列与理论序列一致(图 5.1B, C),表明 pLCDH-HBV_circ_1 成功的在细胞内形成 HBV_circ_1。Real-time PCR 检测发现在 HepG 2 细胞中转染了 1 μ g pLCDH-HBV_circ_1 质粒的细胞 HBV_circ_1 的表达水平比转染 0.5 μ g pLCDH-HBV_circ_1 质粒的高 4 倍(图 5.1D),表明构建的真核表达载体能够实现 HBV_circ_1 在细胞中的表达。

为了后续实验需要,我们还用体外转录法构建了 HBV_circ_1(如图 5.2 所示),将体外合成的 HBV_circ_1 转染 HepG 2 细胞,48 h 后提取总 RNA,经 Rnase R 酶消化后反转录成 cDNA,然后用 HBV_circ_1 鉴定引物进行 RT-PCR 以及 Sanger 测序。结果显示体外合成的 HBV_circ_1 的 junction site 的旁侧序列与理论序列一致,表明已按要求成功合成了 HBV_circ_1。

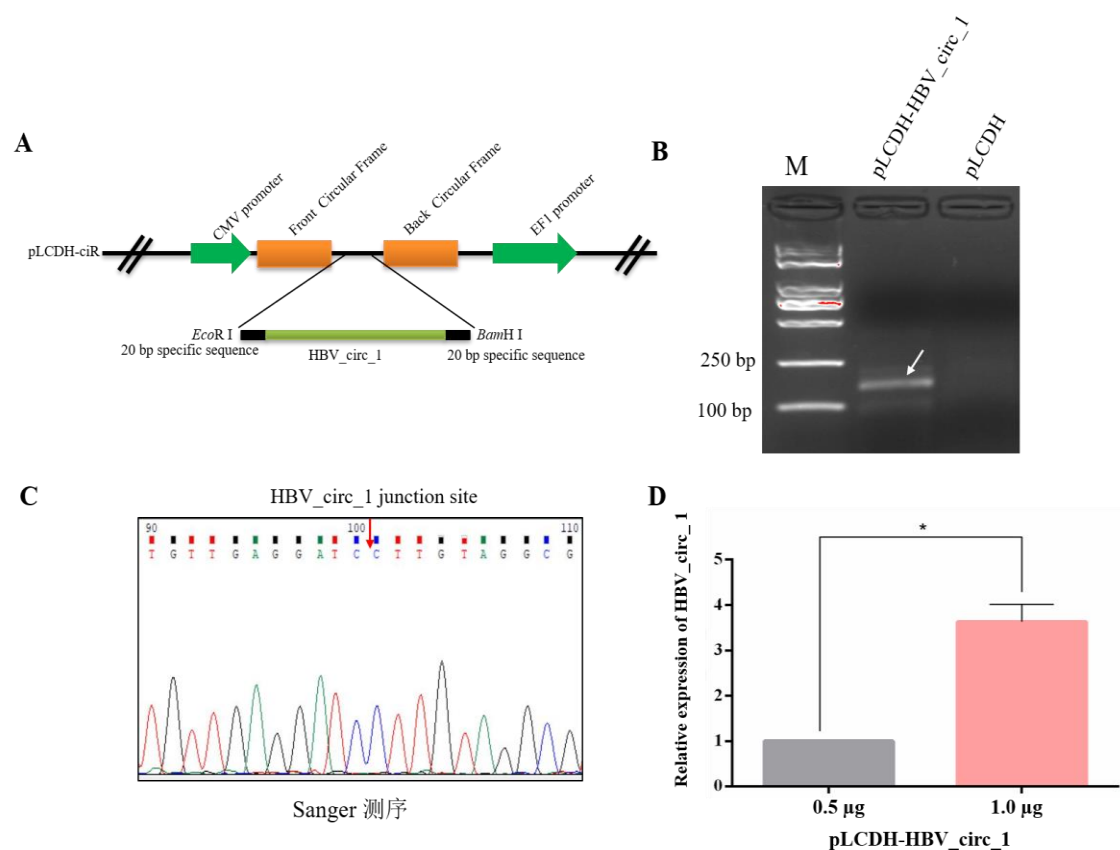


图 5.1 HBV_circ_1 过表达载体构建和在转染细胞中的表达水平

A, HBV_circ_1 过表达载体构建示意图。**B**, 1×10^5 HepG 2 中分别转染 $2 \mu\text{g}$ pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体, 48h 后, 提取总 RNA, 经 Rnase R 酶消化, 反转录后用 HBV_circ_1 鉴定引物进行 PCR。白色箭头表示 RT-PCR 目的条带。**C**, RT-PCR 产物 Sanger 测序图, 红色箭头表示 HBV_circ_1 反向剪切的连接位点。**D**, 1×10^5 HepG 2 中分别转染 $0.5 \mu\text{g}$ 和 $1 \mu\text{g}$ pLCDH-HBV_circ_1 载体, 48 h 后通过 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 表达水平。

Figure 5.1 Construction of HBV_circ_1 overexpression Vector and Verification of the expression level

A, Construction schematics of HBV_circ_1 over-expression vector. **B**, Transfection of HepG 2 cells $2 \mu\text{g}$ pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1. 48 hours later, total RNA was extracted and digested by Rnase R, and then reverse transcription. PT-PCR was performed by HBV_circ_1 identification primer. **C**, Sanger sequencing of RT-PCR

products, red arrow indicates the back-splicing junction site of HBV_circ_1. **D**, 0.5 μg and 1 μg pLCDH-HBV_circ_1 vector was transfected into 1×10^5 HepG 2 respectively. 48 hours later, the expression of HBV_circ_1 was detected by real-time PCR.

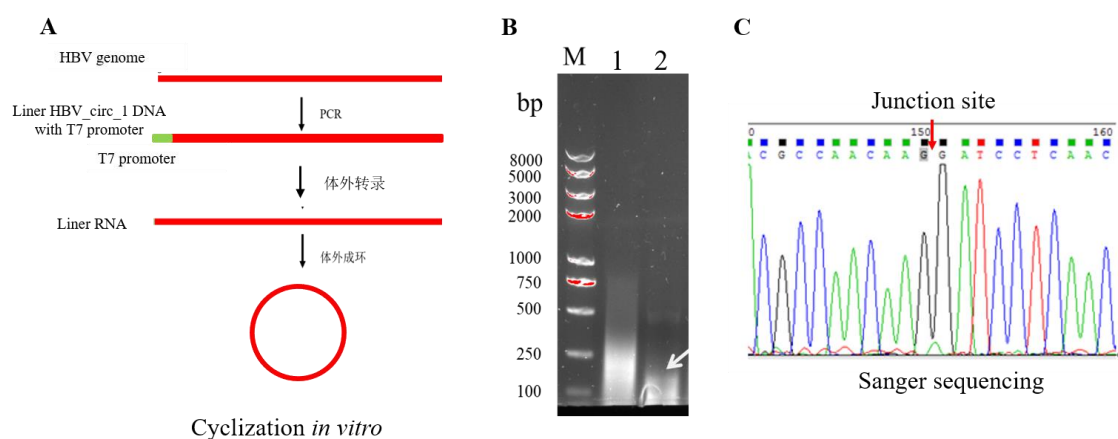


图 5.2 体外构建 HBV_circ_1

A, 体外合成 HBV_circ_1 流程图。**B**, 体外合成的 HBV_circ_1 转染 HepG 2 细胞, 48h 后, 提取总 RNA, 经 Rnase R 酶消化, 反转录后用 HBV_circ_1 鉴定引物进行 RT-PCR。泳道 1 表示未转染的 HepG2 细胞, 泳道 2 表示转染了 HBV_circ_1 的 HepG2 细胞, 白色箭头表示目的条带。**C**, RT-PCR 产物 Sanger 测序图, 红色箭头表示 HBV_circ_1 反向剪切的连接位点。

Figure 5.2 Synthesis of HBV_circ_1 in vitro

A, Flow chart of in vitro synthesis of HBV_circ_1. **B**, Transfection of HepG 2 cells with synthetic HBV_circ_1 in vitro. 48 hours later, total RNA was extracted and digested by Rnase R, and then reverse transcription. PT-PCR was performed by HBV_circ_1 identification primer. **C**, Sanger sequencing of RT-PCR products, red arrow indicates the back-splicing junction site of HBV_circ_1.

3.2 HBV_circ_1 影响肝癌细胞表型特征

通过将脂质体包裹表达载体 pLCDH-HBV_circ_1 转染入进肝癌细胞株 HepG2, 以转 pLCDH-空载作为阴性对照组。利用流式细胞术调查了 HBV_circ_1 对细胞增殖 (CFSE 染色法)、细胞周期 (PI 法) 和细胞凋亡 (Annexin V-PE/7-AA 试剂盒) 等细胞表型特征的影响, 结果显示转染 pLCDH-HBV_circ_1 的 HepG2 细胞的 G2/M

期的细胞比例增加, 细胞周期进程加快 (图 5.3), 早期凋亡受到抑制 (图 5.4 A), 表明 HBV_circ_1 能促进肝癌细胞株 HepG 2 的增殖、显著抑制了肝癌细胞株 HepG2 的早期凋亡。Transwell 检测结果显示 HBV_circ_1 促进 HepG2 细胞的迁移 (图 5.4 B)。根据这些初步的研究结果, 推测 HBV_circ_1 可能参与 HBV 相关肝细胞癌中发生和发展过程。

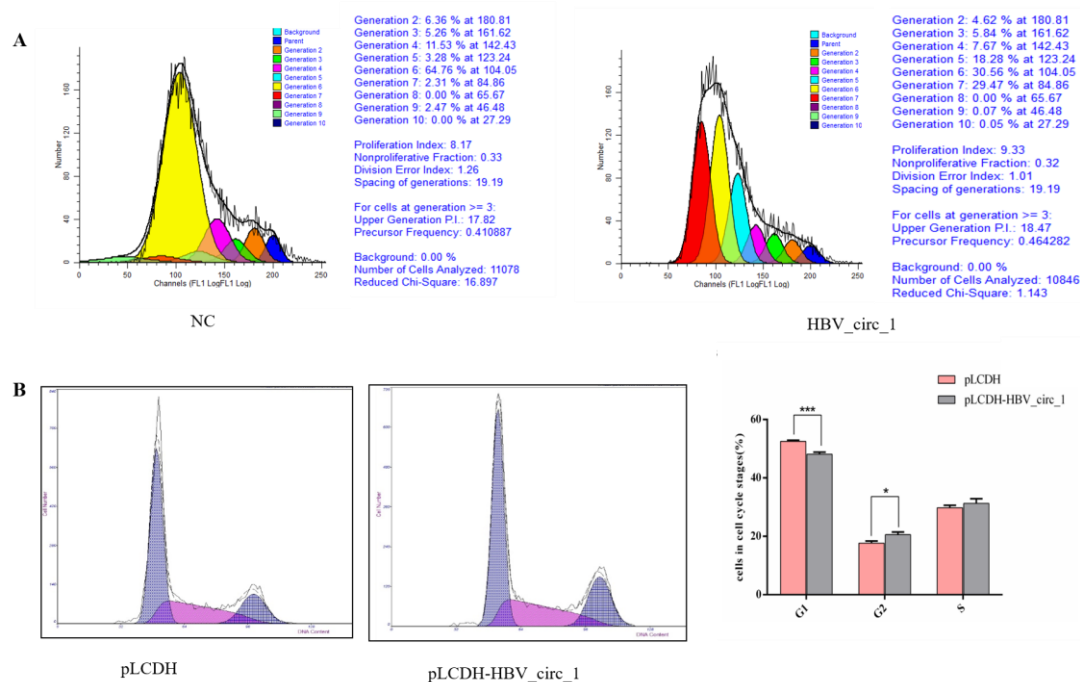


图 5.3 HBV_circ_1 过表达对细胞增殖和细胞周期的影响

A, 流式检测 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 转化细胞的细胞增殖 (CFSE 法)。B, 左: 流式检测 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 转化细胞的周期结果。右: 统计细胞周期的流式结果, 以细胞总数的百分比表示, 共检测 10^4 个细胞。HBV_circ_1 减少 G1 期细胞, 增加 S 和 G2 期细胞。 (** P 值 ≤ 0.001 , * P 值 ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$)

Figure 5.3 Cell proliferation and cell cycle were regulated by HBV_circ_1 by flow cytometry (FACS) analysis.

A. Cell proliferation of HepG2-pLCDH-HBV_circ_1- and HepG2-pLCDH-transformed cells were determined by flow cytometry. B. Left: Cell cycle of HepG2-pLCDH-HBV_circ_1- and HepG2-pLCDH- transformed cells were determined

by flow cytometry. Right: Results of FACS analysis were presented as the percentage of total cells. Expression of HBV_circ_1 decreased the number of cells in G1 phase and increased the number of cells in S and G2 phases. (** P value ≤ 0.001 , * P value ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$) .

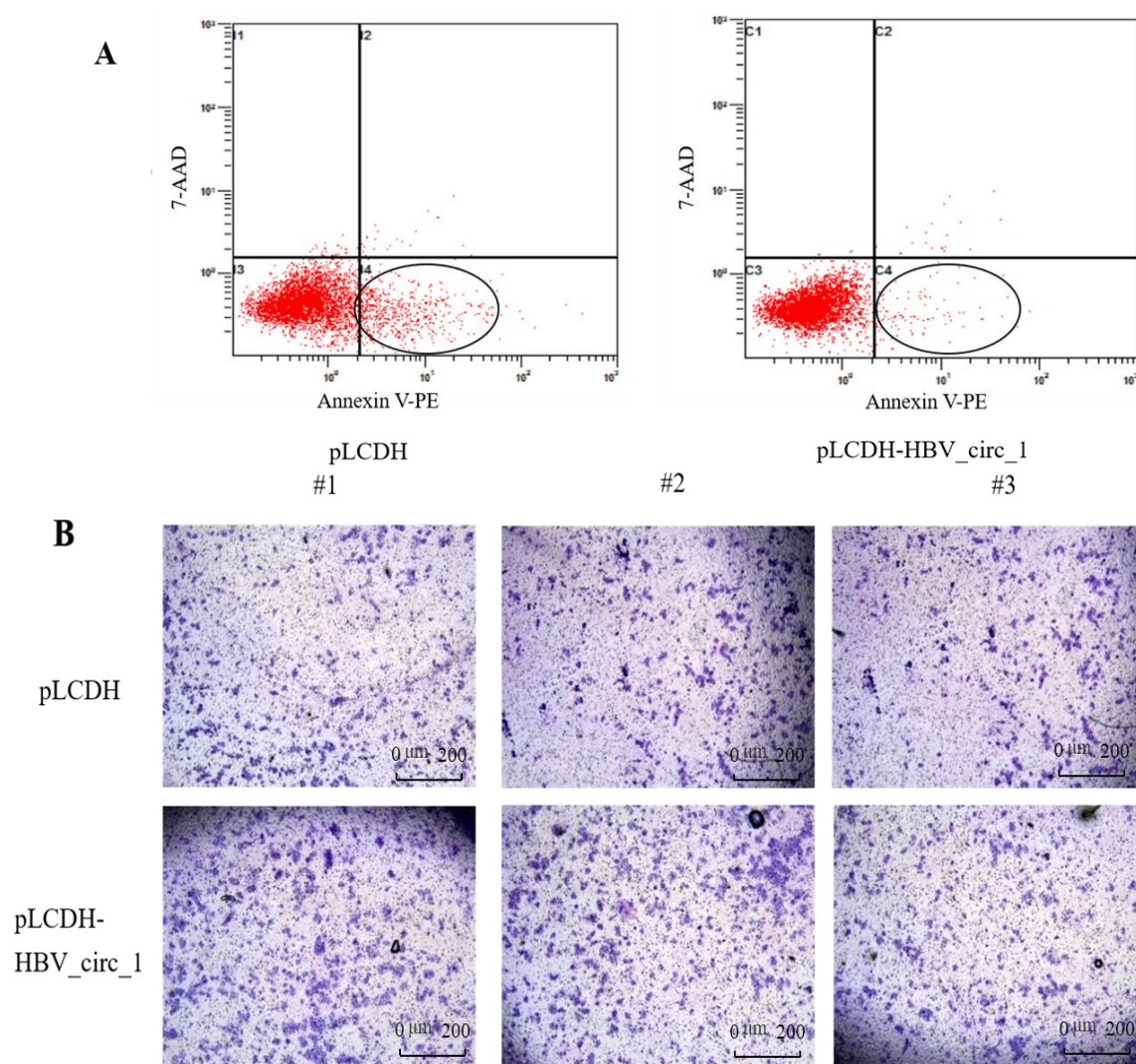


图 5.4 HBV_circ_1 过表达影响细胞凋亡和细胞迁移

A, 5×10^5 个 HepG 2 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h, 分别向细胞中转染 2 μ g pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体, 48 h 后收集细胞流式检测细胞凋亡情况。黑色圆圈里表示早期凋亡的细胞。B, 5×10^5 个 HepG 2 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h, 分别向细胞中转染 2 μ g pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体, 24 h 后消化细胞通过

Transwell 实验检测细胞迁移能力, 每个小室加 10^4 个细胞。每组实验重复了 3 次, #1、#2、#3 代表每次实验的编号。

Figure. 5.4 Over-expression of HBV_circ_1 affects cell apoptosis and cell migration

A, HepG 2 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 2 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 vector. 48 hours later, the cells were collected and the apoptosis was detected by flow cytometry. **B**, HepG 2 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 2 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 vector. 24 hours later, the ability of cell migration was detected by transwell assay.

3.3 HBV_circ_1/hsa-miRNA-6124/ST7 调节网络

circRNA 通过与疾病关联的 miRNA 相互作用在疾病中发生发展过程中发挥着重要的调控作用。为了明确 HBV_circ_1 与 miRNA 的相互作用关系, 我们通过生物信息学分析了与 HBV_circ_1 可能相互作用的 miRNAs 位点, 结果显示 HBV_circ_1 具有 235 个 miRNAs 的结合位点, 推测 HBV_circ_1 可能作为 miRNA 海绵调节细胞基因的表达, 参与 HCC 发生和发展过程。根据预测结果的打分值以及其靶基因是否与肿瘤相关, 我们从中挑选出了可能与 HBV_circ_1 存在相互作用的 miRNA, 并设计这些潜在的 miRNA 茎环引物, 利用 RNA pull-down 技术, 诱捕与 HBV_circ_1 相互作用的 miRNA 分子(图 5.5 A)。经过 PCR 鉴定和测序发现: has-miR-6124 和 has-miR-194-3p 可能与 HBV_circ_1 存在潜在的相互作用关系(图 5.5 B, 附录四)。为了更进一步明确 HBV_circ_1 与 has-miR-6124 的互作关系, 我们又对 RNA pull down 产物进行了 real-time PCR 分析, 结果显示在用 HBV_circ_1 特异性探针进行的 pull-down 产物(HBV_circ_1PD)中检测到 HBV_circ_1 显著高于阴性对照的 pull-down 产物(Bead PD), 说明 HBV_circ_1 能够显著富集 has-miR-6124(图 5.5 C)。

为了进一步明确 HBV_circ_1 与 has-miR-6124 的直接相互作用, 我们将 has-miR-6124 的靶位点(图 5.5 D)序列克隆进荧光素酶基因报告载体 pmirGLO 构建重组载体 pmirGLO-vcircRNA1。将 has-miR-6124 的 mimics 与重组荧光素酶基因

报告载体 pmirGLO-vcircRNA1 共转染 HepG2 细胞, 荧光素值检测结果显示, 转染 has-miR-6124 的 mimics 组的荧光酶活性低于转染 mimics-NC 对照组 (图 5.5 F), 说明 HBV_circ_1 与 has-miR-6124 结合; 根据信息学分析结果, has-miR-6124 的候选靶基因为 ST7 (AK297510.1)。因此, 将 ST7 基因的 3'UTR 序列克隆进 pmirGLO 载体中的 luc2 基因与 SV40 加尾信号序列之间, 构建荧光素酶基因报告载体 pmirGLO-ST7 (图 5.5 E), 载体 pmirGLO-ST7 与 has-miR-6124 的 mimics 或对照 mimics-NC 共转染肝癌细胞, 发现转染 has-miR-6124 的 mimics 组的荧光酶活性低于转染 mimics-NC 对照组 (图 5.5 G) 说明 ST7 基因的 3'UTR 具有 has-miR-6124 的靶位点。基于上述结果, 我们推测 HBV_circ_1 可以通过与 hsa-miRNA-6124 相互作用调节 ST7 基因的表达, 从而影响肝癌细胞的进程。

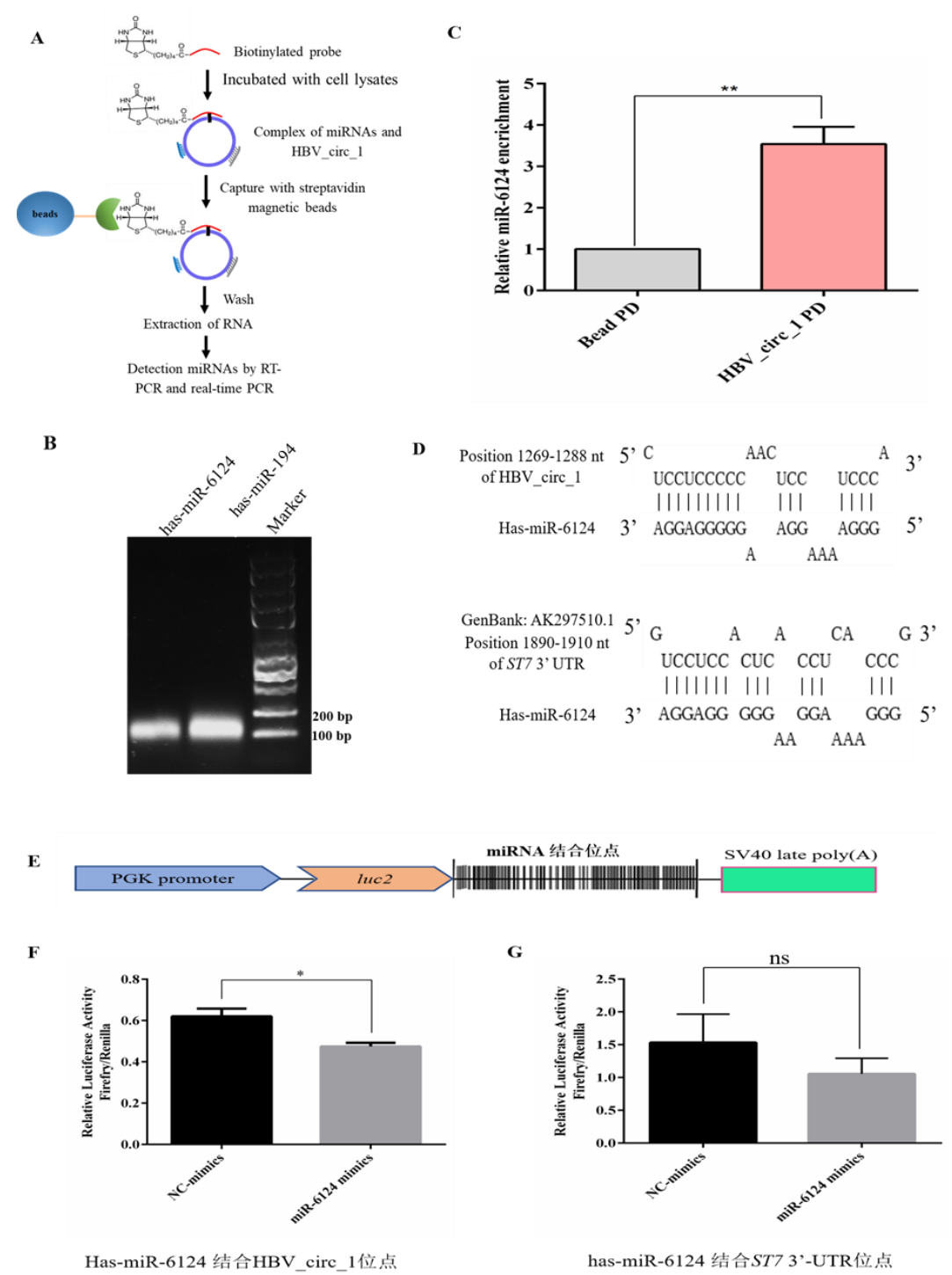


图 5.5 HBV_circ_1/hsa- miRNA-6124/ST7 相互作用

A, circRNA 与 miRNA pull-down 实验方法流程图。**B**, RNA pull-down 产物 RT-PCR 检测。**C**, RNA pull-down 产物 real-time PCR 检测。Bead PD 表示未加生物素标记的探针只加链霉素琼脂糖的 pull-down 产物。HBV_circ_1PD 表示加入生物素标记

的 HBV_circ_1 特异性探针的 pull-down 产物。D, has-miR-6124 在 HBV_circ_1 以及 ST7 3'UTR 上的结合位点位置。E, 荧光素酶基因报告载体结构示意图, 在 miRNA 结合位点区域分别为 has-miR-6124 在 HBV_circ_1 以及 ST7 基因 3'UTR 上的结合位点序列。F 和 G, 0.4 μg 重组萤火虫荧光素酶基因 pmirGLO-ST7/质粒与 0.04 μg 内参质粒 pRL-TK 以及 2 μmol miRNA 模拟体共转染 10^5 的 HepG 2 细胞, 60h 后裂解细胞, 取 100 μg 蛋白测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶作用所释放的光子数。(** P 值 ≤ 0.005 , * P 值 ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$)

Figure 5.5 The interaction of HBV_circ_1, hsa- miRNA-6124 and ST7

A, Flow chart of circRNA and miRNA pull-down experiment. B, Detection of RNA pull-down products by RT-PCR. C, Detection of RNA pull-down products by real-time PCR. D, Predicted duplex formation between has-miR-6124 and the has-miR-6124 binding sites was indicated. E, Construction diagram of luciferase vector. F and G, HepG 2 cells were seeded in 6-well plates at $5 \times 10^5/\text{well}$ and cultured for 24 h. The cells were co-transfected with 0.4 μg recombinant firefly luciferase pmirGLO plasmid, 0.04 μg pRL-TK and 2 μmol miRNA mimics. 60 hours later, the cells were lysed and 100 μg protein was taken to determine the activity of luciferase. (** P value ≤ 0.005 , * P value ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$).

3.4 HBV_circ_1 调控 ST7 的表达水平

当 miRNAs 被 circRNA 吸附时, 理论上细胞内 miRNA 的总量不会发生变化, 难以通过 qRT-PCR 检测来判断 miRNA 是否吸附。因此本研究根据可能的 HBV_circ_1/hsa- miRNA-6124/ST7 调节网络, 通过过表达 HBV_circ_1, 根据 miRNA 的下游基因 ST7 的表达水平, 间接评估 HBV_circ_1 对 miRNA-6124 的功能抑制。将 HBV_circ_1 表达载体 pLCDH-HBV_circ_1 和对照载体 pLCDH-null 分别转染在肝癌细胞, 通过 real-time PCR 检测 ST7 基因表达水平, 发现过表达 HBV_circ_1 能显著抑制 ST7 的表达水平(图 5.6 A)。进一步我们又通过 RNAi 敲降 HBV_circ_1 水平对 ST 基因表达水平的影响。首先检测了 3 条 siRNA 在 HepG 2.2.15 中下调

HBV_circ_1 的效率, 结果显示 siRNA-3 下调 HBV_circ_1 水平的效率最高 (图 5.6 B), 因此后续实验中采用 siRNA-3 敲低 HBV_circ_1 水平。将 HBV_circ_1 的 siRNA-3 和对照 siRNA-NC 分别转染肝癌细胞 HepG2.2.15, 48 h 后利用 real-time PCR 检测 ST7 基因表达水平, 结果显示沉默 HBV_circ_1 的表达水平, 则显著性地提高了 ST7 基因的表达水平 (图 5.6 C), 表明 ST7 基因的表达水平受到 HBV_circ_1 的调控。

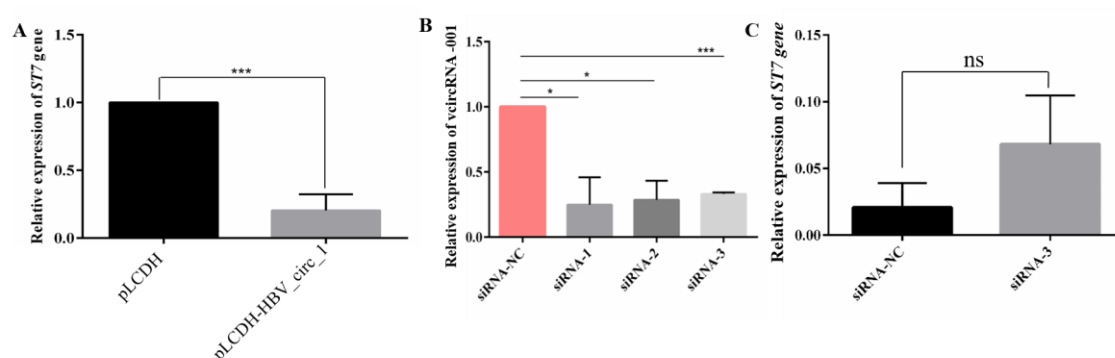


图 5.6 HBV_circ_1 抑制 ST7 基因表达水平

A, 5×10^5 个 HepG 2 细胞接种在 6 孔板中培养 24h, 分别转染 2 μ g pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体, 48 h 后提取总 RNA 通过 real-time PCR 检测 ST7 基因表达水平。B, 5×10^5 个 HepG 2.2.15 细胞接种在 6 孔板中培养 24h, 分别向细胞中转染 5 μ mol siRNA (siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3, siRNA-NC), 48 h 后提取总 RNA 通过 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 表达水平。C, 5×10^5 个 HepG 2.2.15 细胞接种在 6 孔板中培养 24h, 分别向细胞中转染 5 μ mol siRNA (siRNA-3, siRNA-NC), 48 h 后提取总 RNA 通过 real-time PCR 检测 ST7 表达水平。 (***) P 值 ≤ 0.001 , * P 值 ≤ 0.05 , 每个样品检测 3 次, 每个实验重复 3 次。Error bars, $n = 3$)

Figure. 5.6 HBV_circ_1 inhibits ST7 gene expression

A, HepG 2 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 2 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 vector. 48 hours

later, the total RNA was extracted and the expression level of *ST7* was detected by real-time PCR. **B**, HepG 2.2.15 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 5 μ mol siRNA (siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3, siRNA-NC). 48 hours later, the total RNA was extracted and the expression level of HBV_circ_1 was detected by real-time PCR. **C**, HepG 2.2.15 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 5 μ mol siRNA (siRNA-3, siRNA-NC). 48 hours later, the total RNA was extracted and the expression level of *ST7* was detected by real-time PCR. (***) P value ≤ 0.001 , * P value ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$)

3.5 HBV_circ_1 相互作用蛋白的筛选与鉴定

据报道, circ-Foxo 3 能与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 (P21) 及细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK 2) 相互作用形成三元复合物调控细胞周期^[6]。在本研究中, 我们探讨 HBV_circ_1 是否也可能与蛋白质相互作用发挥功能。我们通过 RNA pull-down 实验结合质谱技术 (图 5.7A) 对 HBV_circ_1 候选互作蛋白质进行了筛选和鉴定。RNA pull-down 沉淀复合物的 SDS-PAGE 检测结果显示, 与 circ_gfp 对照组相比, 在 35 kDa 的位置存在差异蛋白带 (图 5.7 B)。差异条带的质谱鉴定结果如表 5.8 显示, 在可能与 HBV_circ_1 相互作用的候选蛋白中有与剪接相关的 SRSF1, SRSF2, U2AF1 等, 也有与细胞周期相关的 CDK1, CDK18 以及与翻译相关的 EEF1A1。

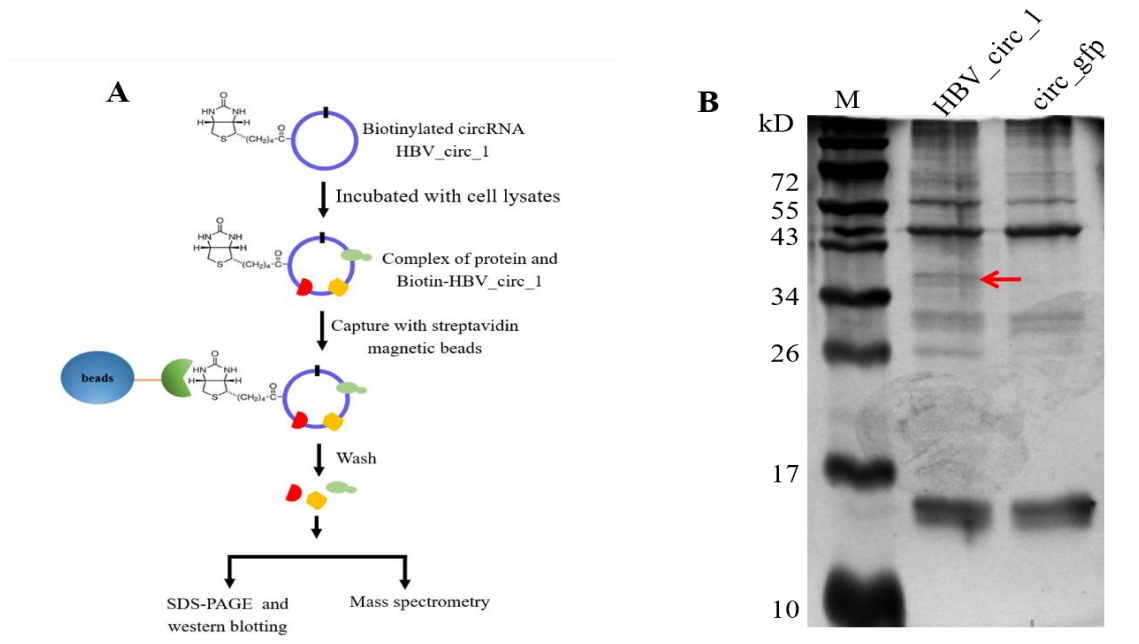


图 5.7 RNA pull-down 得到的链霉素磁珠- HBV_circ_1-蛋白复合物的 SDS-PAGE 分析

A. RNA pull-down 流程图。B.根据 RNA 提取流程图，将 HepG 2 细胞的全细胞裂解物与生物素标记的 HBV_circ_1 孵育。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 RNA pull-down 产物，红色箭头代表特异条带。

Figure 5.7 SDS-PAGE analysis of Streptomycin-Magnetic beads-HBV_circ_1 protein complex obtained by RNA pull-down

A, The RNA pull-down flowchart. B, according to the RNA pull-down flowchart, whole-cell lysates from HepG2 cells were incubated with biotinylated probes against HBV_circ_1. The products of pull-down were detected by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and by western blotting, and the red arrow represents a specific band.

表 5.8 RNA pull-down 筛选获得的 HBV_circ_1 互作蛋白的质谱鉴定

Protein Name		Pep Count/Unique Pep Count	Peptide Sequence
SRSF1:	HUMAN	11/9	K.DIEDVIFYK.Y/ R.DAEDAVYGR.D
Serine/arginine-rich-splicing factor 1			
PHB: HUMAN Prohibitin		8/8	K.AAIISAEGDSK.A/ K.EFTEAVEAK.Q

RACK1: HUMAN Receptor of activated protein C kinase 1	5/5	K.DVLSVAFSSDNR.Q/ K.IWDLEGK.I
ANXA2: HUMAN Annexin A2	4/4	K.AYTNFDAER.D/ R.DLYDAGVK.R
U2AF1: HUMAN Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	4/4	K.AVIDLNNR.W/ R.NPQNSSQSADGLR.C
SRSF2: HUMAN Serine/arginine-rich-splicing factor 2	3/3	K.VDNLTYSR.T/R.VGDVYIPR.D
CDK1: HUMAN Cyclin-dependent kinase 1	1/1	R.SPEVLLGSAR.Y
EEF1A1: HUMAN Elongation factor 1-alpha 1	1/1	K.IGGIGTVPVGR.V
CDK18: HUMAN Cyclin-dependent kinase 18	1/1	R.ASGALPR.Q
SNRPB2: HUMAN U2 small nuclear ribonucleoprotein B	1/1	R.DALQGFK.I
ZNF26: HUMAN Zinc finger protein 26	1/1	K.SLTQNSAPSR.S
EXOSC6: HUMAN Exosome complex component MTR3	1/1	R.GGGPAGAGGEAPAALR.G
MAPKAP1: HUMAN Target of rapamycin complex 2 subunit	1/1	K.QSAQELK.S

为进一步验证这些候选蛋白是否真的能同 HBV_circ_1 相互作用, 我们利用相关蛋白的抗体进行了 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验 (RNA Immunoprecipitation, RIP), 结果显示 CDK1 抗体、EEF1A1 抗体能够富集较高水平 HBV_circ_1 (图 5.8)。细胞免疫荧光实验结果显示 HBV_circ_1 与 CDK1 在细胞质中共定位 (图 5.9), 而与 EEF1A1 主要在细胞核中存在共定位, 少量共定位在细胞质 (图 5.10), 而线性化的 HBV_circ_1 与蛋白 CDK1 以及 EEF1A1 不存在共定位 (图 5.9-10)。表明 HBV_circ_1 与蛋白 CDK1 以及 EEF1A1 的共定位是 HBV_circ_1 特异性的。此外, 通过 western blotting 可在用 HBV_circ_1 进行的 pull-down 的沉淀复合物中检测到了 CDK1 和 EEF1A1 蛋白 (图 5.11), 进一步证实了 HBV_circ_1 能与蛋白 CDK 1 及 EEF1A1 发生相互作用。

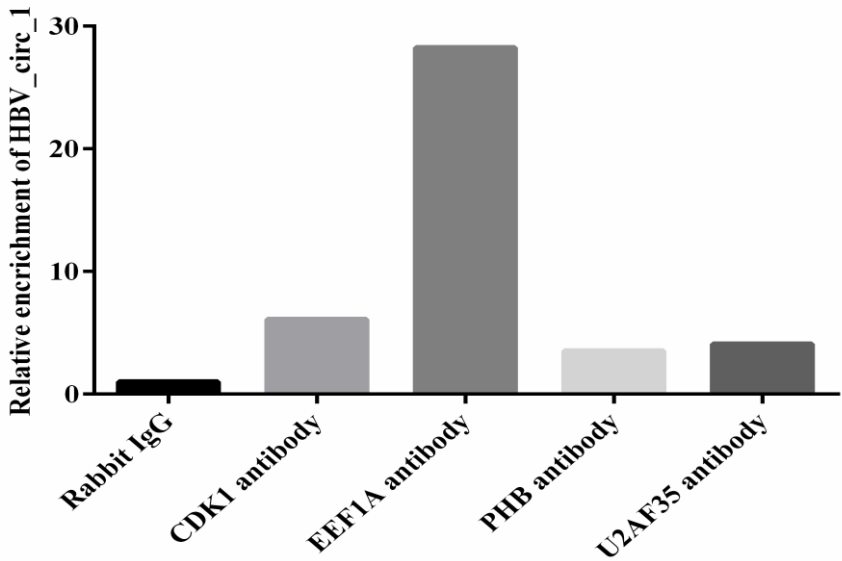


图 5.8 RIP (RNA Immunoprecipitation) 实验表明 CDK1 和 EEF1A1 能富集 HBV_circ_1

Figure 5.11 RIP (RNA Immunoprecipitation) experiments show that CDK11 and EEF1A1 can enrich HBV_circ_1.

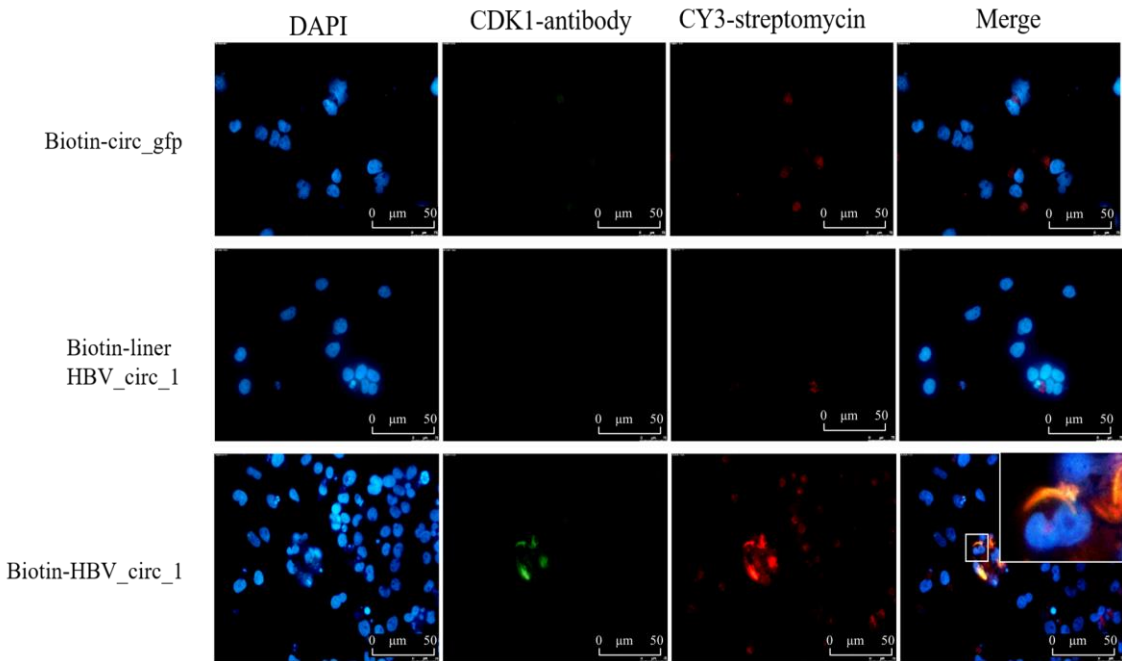


图 5.9 HBV_circ_1 与蛋白 CDK1 共定位

1×10^5 个 HepG 2 接种在 24 孔板中培养 24h, 将 20 pmol 生物素标记的 HBV_circ_1 转染进细胞, 生物素标记的 circ_gfp 以及生物素标记的线性 HBV_circ_1 作为对照。

红色荧光表示 CY3 标记的生物素抗体,绿色荧光表示 CDK1 抗体,蓝色表示 DAPI。一抗为 CDK1 兔抗 (1: 1000), 二抗为 FITC 标记的羊抗兔抗体 (1: 200), 生物素抗体为 CY3 标记的链霉素。

Figure 5.9 Co-localization of HBV_circ_1 and protein CDK1

HepG 2 cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 20 pmol biotin-HBV_circ_1, biotin-circ_gfp and biotin-liner-HBV_circ_1, respectively. Red fluorescence indicates the CY3-conjugated anti-biotin antibody, green fluorescence indicates the anti-CDK1 polyclonal antibody, blue indicates DAPI. The first anti-body is rabbit anti-CDK1 polyclonal antibody (1:500) and the second is FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200). The CY3-conjugated anti-biotin antibody is CY3-streptomycin (1:200).

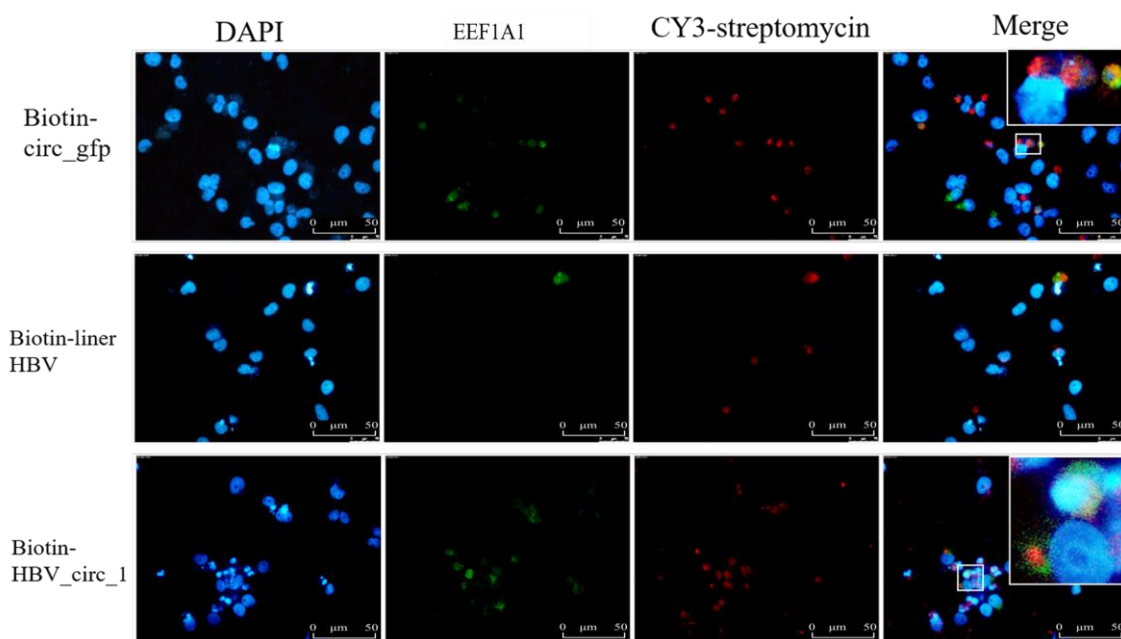
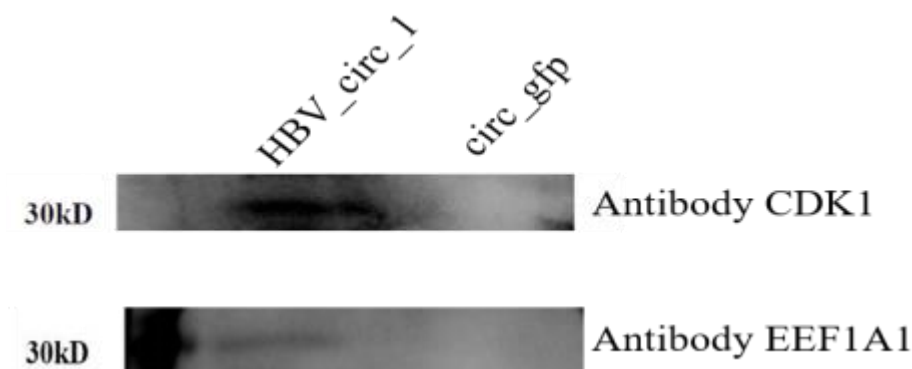


图 5.10 HBV_circ_1 与蛋白 EE1A1 共定位

1×10^5 个 HepG 2 接种在 24 孔板中培养 24h, 将 20 pmol 生物素标记的 HBV_circ_1 转染进细胞, 生物素标记的 circ_gfp 以及生物素标记的线性 HBV_circ_1 作为对照。红色荧光表示 CY3 标记的生物素抗体, 绿色荧光表示 EE1A1 抗体, 蓝色表示 DAPI。一抗为 EE1A1 兔抗 (1: 500), 二抗为 FITC 标记的羊抗兔 (1: 200), 生物素抗体为 CY3 标记的链霉素。

Figure 5.10 Co-localization of HBV_circ_1 and protein EEF1A1

HepG 2 cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 20 pmol biotin-HBV_circ_1, biotin-circ_gfp and biotin-liner-HBV_circ_1, respectively. Red fluorescence indicates the CY3-conjugated anti-biotin antibody, green fluorescence indicates the anti-EEF1A1 polyclonal antibody, blue indicates DAPI. The first anti-body is rabbit anti-EEF1A1 polyclonal antibody (1:1000) and the second is FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200). The CY3-conjugated anti-biotin antibody is CY3-streptomycin (1:200).

**图 5.11 Western blotting 检测 RNA pull-down 复合物中 CDK1 和 EEF1A1 蛋白**

HBV_circ_1 pull-down 复合物中用 CDK1 抗体可检测到 CDK1 蛋白, 在 circ_gfp pull-down 复合物中无信号条带, 同样用 EEF1A1 抗体可检测到 EEF1A1 蛋白, 在 circ_gfp pull-down 复合物中无信号条带。

Figure. 5.11 Detection of CDK1 and EEF1A1 in RNA pull-down complexes by Western blotting

CDK1 protein was detected in HBV_circ_1 pull-down complex by CDK1 antibody, but no signal was in circ_gfp pull-down complex. In the same way, EEF1A1 protein was also detected by EEF1A1 antibody, and no signal in circ_gfp pull-down complex.

3.6 HBV_circ_1 能上调 CDK1 的蛋白水平

HBV_circ_1 被发现能加快细胞周期的进程, 而且能与细胞周期相关蛋白 CDK1 相互作用。已有研究表明 CDK1 是 CDK 家族成员中的创始成员, 它能与细胞周期蛋白结合促进细胞周期的进展, 其表达水平的异常表达也会造成细胞周期

的紊乱。HBV_circ_1 调控细胞周期不仅仅是其与 CDK1 互作,还有可能改变 CDK1 在细胞中的表达水平。为了证明这一推测,我们通过 Western blotting 检测了过表达 HBV_circ_1 对 CDK1 蛋白水平的影响,结果显示,与对照组相比,在过表达 HBV_circ_1 的细胞中,CDK1 蛋白水平明显上调(图 5.12),然而第六章的 RNA-seq 数据表明过表达 HBV_circ_1,肝癌细胞中 CDK1 的 mRNA 水平并没有显著升高,所以我们推测 HBV_circ_1 与 CDK1 互作提高了 CDK1 的稳定性从而促进细胞周期。

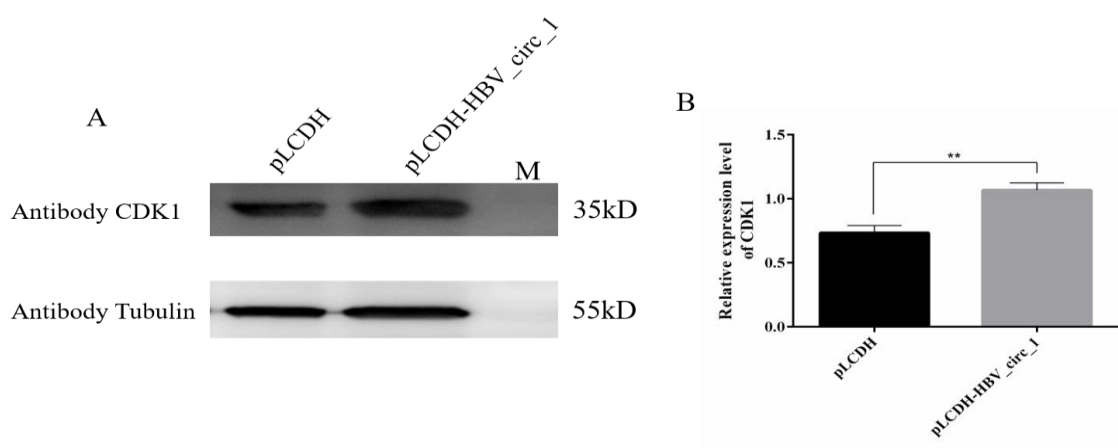


图 5.12 HBV_circ_1 影响 CDK1 在细胞中的蛋白水平

5×10^5 个 HepG 2.2.15 细胞接种在 6 孔板中培养 24h, 分别向细胞中转染 2 μ g pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体, 48 h 后提取总蛋白通过 western blotting 检测 CDK1 表达水平。A, Western blotting 结果, 每个泳道蛋白加样量为 30 μ g。B, Western blotting 条带的灰度值分析结果。(** P 值 ≤ 0.005 , 实验重复 2 次, Error bars, $n = 2$)

Figure. 5.12 HBV_circ_1 affects the protein level of CDK1 in cells

HepG 2.2.15 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 2 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 vector. 48 hours later, the total protein was extracted and the expression level of CDK1 was detected by western blotting. **A**, The results of western blotting results. The amount of protein added in each lane was 30 μ g. **B**, Gray value Statistics for western blotting bands. (** P value

≤ 0.005 , Error bars, $n = 2$)

3.7 HBV_circ_1 促进 HBV 病毒基因表达

以往的研究表明，有些病毒可以产生功能性非编码 RNA，不仅在调控宿主细胞基因的表达方面发挥重要作用，还能调控病毒本身基因的表达^[10]。为了检测 HBV_circ_1 对 HBV 基因表达的影响，我们在 HBV 阳性的 HepG2.2.15 细胞中分别用 siRNA 沉默 HBV_circ_1 表达和过表达 HBV_circ_1，然后 real-time PCR 检测 HBV P 基因的表达水平，结果显示用 si-RNA 沉默 HBV_circ_1 表达后，P 基因的表达水平约下调了 4 倍（图 5.13 A），而过表达 HBV_circ_1，P 基因的表达水平上调 1.5 倍（图 5.13 C），表明 HBV_circ_1 能促进病毒本身基因的表达。

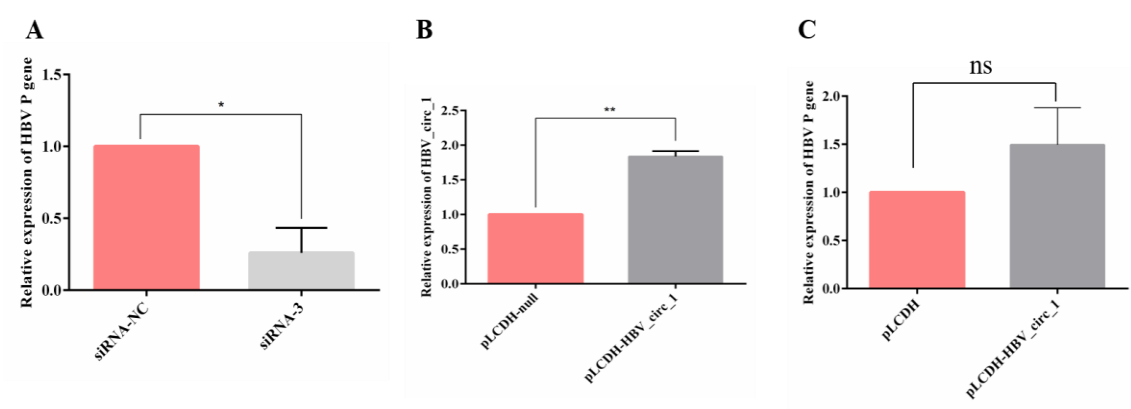


图 5.13 HBV_circ_1 促进 HBV 基因表达

A, 5×10^5 个 HepG 2.2.15 细胞接种在 6 孔板中培养 24h，分别转染 5 μ mol siRNA-3 和 siRNA-NC，48 h 后提取总 RNA 通过 real-time PCR 检测 P 基因表达水平。B，C， 5×10^5 个 HepG 2.2.15 细胞接种在 6 孔板中培养 24h，分别转染 2 μ g pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 载体，48 h 后提取总 RNA 通过 real-time PCR 检测 HBV_circ_1 和 P 基因表达水平。（** P 值 ≤ 0.005 ，* P 值 ≤ 0.05 ，每个样品检测 3 次，每个实验重复 2 次。Error bars, $n = 2$ ）

Figure 5.13 HBV_circ_1 promotes the gene expression of HBV

A, HepG 2.2.15 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h.

The cells were transfected with 5 μ mol siRNA-3 and siRNA-NC. 48 hours later, the total RNA was extracted and the expression level of P gene was detected by real-time PCR. B, C, HepG 2.2.15 cells were seeded in 6-well plates at 5×10^5 /well and cultured for 24 h. The cells were transfected with 2 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 vector. 48 hours later, the total RNA was extracted and the expression level of HBV_circ_1(B) and P gene(C) was detected by real-time PCR. (***) P value ≤ 0.005 , 0.005, * P value ≤ 0.05 , Error bars, $n = 3$)

4 讨论

近年来,已明确 circRNA 的具有各种各样的生物学功能。如上文所述, circRNA 可以作为分子海绵来吸附 miRNAs 或蛋白质,并由此调控基因的表达或影响蛋白的功能。有些 circRNA 甚至可以编码蛋白质。然而,细胞编码的 circRNA 的功能在很大程度上仍是未知的。尽管已有报道指出 DNA 病毒可以形成 circRNA,但至今仍无病毒编码的 circRNA 的功能研究。我们的研究结果显示 HBV_circ_1 在 HBV 相关的肝癌组织中表达水平高于癌旁正常组织,推测 HBV_circ_1 可能发挥功能性作用。有研究指出, HCC 组织中高表达的细胞 circRNAs 是细胞增殖、迁移、侵袭的正调控因子^{[11][13]}。本研究发现 HBV_circ_1 能改变肝癌细胞表型特征,包括促进肝癌细胞株 HepG2 的增殖和周期进程,促进肝癌细胞株 HepG2 迁移及抑制肝癌细胞株 HepG2 的凋亡。表明 HBV_circ_1 参与肝细胞癌的发生或发展进程。已有研究表明,在 HCC 中,差异表达的 circHIPK3^[5], circRBM23^[14], circSMAD^[15] 均能作为 miRNA 海绵体发挥作用调控细胞表型特征的作用。因此 HBV_circ_1 有可能通过 circRNA-miRNA-mRNA 网络调控细胞表型。生物信息学分析显示, HBV_circ_1 具有 235 个潜在的 miRNA 结合位点,进一步的实验证明 HBV_circ_1 能与 has-miR-6124 结合。双荧光素酶基因报告系统显示 ST7 是 has-miR-6124 的靶基因,由此我们推测 HBV_circ_1 可以通过与 hsa-miRNA-6124 互作调节 ST7 表达水平。通常在 circRNA-miRNA-mRNA 调节网络中, mRNA 的水平受到 circRNA 的正调控,而在本研究中发现,过表达 HBV_circ_1 能显著抑制 ST7 的表达水平,相反地, siRNA 沉默 HBV_circ_1, ST7 的表达水平升高,说明 ST7 基因的表达水平受到 HBV_circ_1 的负调控,这不符合普遍认为的 miRNA 结合在基因 3'UTR 抑

制基因转录或促进 mRNA 降解的机制。然而随着有关 miRNA 的研究越来越多,也有一些发现认为,miRNA 可以通过与启动子互作激活下游基因表达^[16]。因此我们猜想 ST7 启动子上可能存在 hsa-miRNA-6124 互作位点,通过网站 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>)预测发现 hsa-miRNA-6124 在 ST7 的 5'UTR 有潜在的结合位点。也有可能有一个参与调控 ST7 基因的转录因子受到 hsa-miRNA-6124 的调控,从而影响 ST7 的表达水平。研究表明,ST7 是人类染色体 7q31.1 上的抑癌基因之一,完整的 7 号染色体已被证明能抑制高度恶性的人前列腺癌 PC3 细胞的成瘤生长,克隆序列分析发现 7q 含有抑制肿瘤的序列。进一步的研究表明,ST7 能抑制 PC3 癌细胞在裸鼠体内成瘤^[17]。此外,Charong 等人发现 ST7 表达水平与细胞周期相关。在细胞周期阻滞时 ST7 表达过高,当细胞重新进入细胞分裂状态时,它的表达下调^[18]。因此,HBV_circ_1 下调 ST7 的表达水平从一定程度上可以解释其促进肝癌细胞株 HepG2 的增殖和周期进程的分子机制。

CircRNAs 的生物功能除了可以抑制 miRNA 的功能外,它还能作为蛋白质的海绵体,调控蛋白质的活性。例如 circ-foxo3 在肺癌细胞中高表达并且与细胞周期进程相关^[6],它能与 CDK2 和 p21 结合,从而形成 circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物。通常,CDK2 能与细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 E 结合进而促进细胞周期进程,而一旦 p21 激活则会抑制 CDK2 与周期蛋白的结合,从而阻止细胞周期进程^[19],circ-foxo3-p21-CDK2 三元复合物的形成遏制了 CDK2 的功能,从而阻断了细胞周期进程。为了进一步探讨 HBV_circ_1 行使生物学功能的分子机制,我们筛选鉴定了与 HBV_circ_1 相互作用的蛋白,结果显示 HBV_circ_1 能与 CDK1、EEF1A 蛋白发生相互作用。细胞周期的失控是细胞恶性的重要原因。细胞周期调控的核心是组蛋白激酶、细胞周期素和细胞周期素依赖性蛋白激酶 (CDK),细胞周期蛋白 (Cyclin 和 CDKs) 的异常表达,或 CDK 抑制蛋白的缺失都可引起细胞周期的紊乱,从而导致细胞增殖失控,最终导致癌变。CDK1 是 CDK 家族成员中的创始成员,它能与细胞周期蛋白结合并促进细胞周期的进展^{[19][20]},Neganova 等发现 CDK1 具有调控有丝分裂、G2/M 期转换、细胞凋亡等功能^[21]。在本研究中,我们发现 HBV_circ_1 能与 CDK 1 蛋白相互作用,并且在 HepG 2 过表达 HBV_circ_1 会造成 CDK1 蛋白水平上调。因此我们认为 HBV_circ_1 促进细胞周期进程可能是通过其与 CDK1 相互作用及上调 CDK1 的蛋白水平共同作用的结果。

据报道, CDK 1 是 cyclin A 和 cyclin B 的结合蛋白^[22], HBV_circ_1 与 CDK1 相互作用是否影响 HBV_circ_1 与 cyclin A 和 cyclin B 的结合有待进一步研究。EEF1A1 是 EEF1A 基因编码的一个亚型, 研究表明 EEF1A1 与前列腺肿瘤、肝脏肿瘤的发生均有关系^[23], HBV_circ_1 与 EEF1A1 相互作用也可能是影响肝癌细胞表型特征的一个原因。

为了在体内验证 HBV_circ_1 促进肿瘤形成的能力, 我们已将过表达 HBV_circ_1 以及转染 pLCDH 载体的 HepG 2 细胞接种到裸鼠皮下, 但两种细胞致瘤能力还有待进一步观察统计。

与真核细胞不同, 病毒的基因组大小十分有限。如何充分利用它们有限的基因组在宿主尽可能编码较多的信息, 对病毒而言尤为重要。有研究指出, 有些病毒基因组除了能编码蛋白基因, 还可以产生非编码 RNA, 并且在调节病毒本身的基因表达方面发挥重要作用^[10]。本研究发现, 来源于 HBV 的 HBV_circ_1 过表达能促进 HBV 病毒的增殖, siRNA 沉默 HBV_circ_1 的表达, HBV 增殖受到抑制。乙肝病毒的持续复制是乙肝致病的根本原因, 乙肝治疗的根本目的是抑制病毒复制。因此, HBV_circ_1 可能作为一个新的抗病毒治疗靶点。

参考文献

- [1] Wang M, Yu F, Li P. Circular RNAs: Characteristics, Function and Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(8).
- [2] Valencia-Sanchez, M. A . Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. Genes & Development, 2006, 20(5):515-524.
- [3] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495 (7441):384-8.
- [4] Zhao Z J, Shen J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer[J]. Rna Biology, 2015, 14(5):514.
- [5] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. Nature Communications, 2016, 7(11215).
- [6] Du W W, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(6):2846.

- [7] Hinds P W , Mitnacht S , Dulic V , et al. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins[J]. Cell, 1992, 70(6):993-1006.
- [8] Yang Q , Du W W , Wu N , et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation[J]. Cell Death and Differentiation, 2017, 24(9):1609–1620
- [9] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Circular RNAs: Biogenesis, Function, and a Role as Possible Cancer Biomarkers[J]. Int J Genomics 2017, 6218353.
- [10] Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs[J]. Virology, 2011, 411:325–343.
- [11] Meng J, Chen S, Han JX, et al. Twist1 regulates vimentin through cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res. 2018. Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs[J]. Virology, 2011, 411:325–343.
- [12] Chen G, Shi Y, Liu M et al. Sun, CircHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging mir-124 and regulating aqp3 expression in hepatocellular carcinoma. Cell Death Dis. 2018, 9, 175.
- [13] Guan Z , Tan J , Gao W , et al. Circular RNA hsa_circ_0016788 regulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis through miR-486/CDK4 pathway[J]. Journal of cellular physiology, 2018.
- [14] Wang B, Chen H, Zhang C, et al. Effects of hsa_circRBM23 on hepatocellular carcinoma cell viability and migration as produced by regulating mir-138 expression[J]. Cancer Biother. Radiopharm. 2018, 33, 194–202.
- [15] Zhang X, Luo P, Jing W, et al. circSMAD2 inhibits the epithelial–mesenchymal transition by targeting miR-629 in hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther. 2018, 11: 2853–2863.
- [16] Place R F , Li L C , Pookot D , et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(5):1608-1613.
- [17] Zenklusen J C, Conti C J, Green E D. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31.[J]. Nature Genetics, 2001, 27(4):392.
- [18] Charong N , Patmasiriwat P , Zenklusen J C . Localization and characterization of ST7 in cancer[J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2010,

- 137(1):89.
- [19]Peters, Jan-Michael. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(9):644-656.
- [20]Barford D . Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism[J]. Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences, 2011, 366(1584):3605-3624.
- [21]任静, 蒋孝华. Plk1 和 Cdk1 在细胞周期和肿瘤中的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(6):872-875.
- [22]Brown N R , Korolchuk S , Martin M P , et al. CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK[J]. Nature Communications, 2015, 6:6769.
- [23]程君, 芮耀诚. 真核延长因子 eEF1A 功能研究进展[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(2):89-91.

第六章 HBV_circ_1 能调节肝癌细胞 HepG 2 的基因表达模式

摘要:

为进一步理解 HBV_circ_1 的功能,我们从全基因组水平研究了 HBV_circ_1 对细胞基因表达模式的影响,结果显示,在表达 HBV_circ_1 的 HepG 2 细胞中,共鉴定出 147 个差异表达基因。与对照细胞相比,有 57 个基因表达上调,90 个基因表达下调。差异表达基因的注释结果显示,差异表达基因富集在 PIK-Akt、MAPK 和 Hippo 等与肿瘤相关的信号通路上。此外,在 HBV_circ_1 过表达的 HepG 2 细胞中,基因融合及基因剪接事件均发生了改变。这些结果为全面了解 HBV_circ_1 在 HBV 相关的肝细胞癌中的作用提供了线索。

关键词: HBV_circ_1, RNA-seq, 基因融合, 可变剪切

1 前言

近年来, circRNA 的生物学功能不断被揭示, circRNA 在各种生物过程中起着重要作用。然而,绝大多数 circRNAs 的功能在很大程度上仍是未知的,蛋白质组学、转录组学等技术手段的不断发展结合生物信息学技术为探索生物分子的功能提供了极大的便利。Yang 等利用定量蛋白质组学揭示了肝癌细胞中环状 RNA CDR1as 的调控网络,为全面研究 CDR1as 在调控蛋白方面的功能提供了一种可靠、高效的方法^[1]。

上一章我们已发现 HBV_circ_1 可以通过与 miRNA、蛋白互作发挥功能,为了更加全面地理解 HBV_circ_1 的功能及可能的机制,我们进一步应用 RNA-seq 技术从全基因组水平研究了 HBV_circ_1 表达 HepG 2 细胞基因表达模式的影响,发现 HBV_circ_1 有可能通过改变 PIK-Akt、MAPK 和 Hippo 等与肿瘤相关的信号通路上的基因表达水平、基因融合及基因剪接事件调节肝癌细胞的进展。

2. 材料与方法

2.1 细胞准备

将 5×10^6 的 HepG 2 细胞接种到直径为 11 cm 的细胞培养皿中培养 24 h, 然后向细胞中分别转染 10 μ g pLCDH-HBV_circ_1 及 10 μ g pLCDH 质粒, 48 h 后收集细胞备用。

2.2 mRNA-sequencing

用 TRIzol Reagent 提取细胞总 RNA, 根据第二代文库构建试剂盒 NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit 说明书构建文库。根据说明, 将具有不同索引的文库加载到 Illumina HiSeq[™] 2500 系统中, 进行 2×150 bp paired-end (PE) 测序, 图像分析以及 base calling 是使用 HiSeq Control Software (HCS) + OLB + GAPIipeline-1.6 控制软件进行的。序列处理和分析是由苏州金唯智公司分析。测序的原始数据已上传到了 NCBI 数据库, 转染 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 的细胞 RNA-Seq 测序数据的登录号分别为 SRR8209229 和 SRR8209230。

2.3 mRNA 表达水平分析

利用 Hisat 2 (v.2.0.1) 软件将 clean reads 比对到注释的人类全基因组上。mRNA 表达水平估算与第三章 2.7.1 方法相同

2.4 差异表达 mRNA 的筛选

差异表达 mRNA 的筛选方法与第三章 2.7.2 方法相同。

2.5 差异表达 mRNA 的 GO 和 KEGG 富集分析

差异表达 mRNA 的 GO 和 KEGG 富集分析方法与第三章 2.7.3 方法相同

2.6 基因融合事件分析

融合基因, 是指将两个或多个基因的编码区首尾相连, 置于同一套调控序列(包括启动子、增强子、核糖体结合序列、终止子等)控制之下, 构成的嵌合基因。融合基因的表达产物为融合蛋白。本研究为了探究过表达 HBV_circ_1 是否会对 HepG 2 细胞的基因融合事件造成影响, 利用 STAR-Fusion (<https://github.com/STAR-Fusion/STARFusion/wiki#Outputs>) 在转录组中分析基因融合事件。STAR 通过比对到基因组和转录本中双末端 (paired-end) 关系的序列寻

找候选的基因融合。

2.7 基因可变剪切分析

可变剪接使一个基因产生多个 mRNA 转录本，不同 mRNA 可能翻译成不同蛋白。因

此，通过可变剪接一个基因可能产生多个蛋白，极大地增加了蛋白多样性。本研究为了探究过表达 HBV_circ_1 是否会对 HepG 2 细胞的可变剪切造成影响，利用 rMATS（3.2.5）软件对可变剪切事件进行差异分析，对检测的结果按照差异显著性标准（FDR≤0.05, IncLevel Differenc>0.02）进行筛选，统计差异可变剪切的情况。

2.8 Real-time PCR

为了验证 RNA-Seq 结果的可靠性，随机选择 5 个基因通过 Real-time PCR 对 RNA-Seq 结果进行验证。RNA 提取，反转录以及 real-time PCR 体系和程序设定同第三章。定量引物见表 6.1。

表 6.1 Real-time PCR 引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
ATOH7	CTGCACTCTCCGACAGCTAC	TGGGAAAGCCTGAGACTCCT
MAPK13	GGACGTCAACAAGACAGCCT	TTGGCGAAGATCTCGGACTG
IKBKGP1	GAGACACAGGAACCAGCAAGG	GCACCATCATTTTCTCCTCCTCA
HIST1H4K	CGCCGTGACCTATACAGAGC	GAAAGGGACGCTCAACCACC
SPINK6	AACCTCAGCTGGACAAAGCA	CACAGTCAACCTGTCCTCCC

2.9 数据统计分析

采用 GrapPad Prism 6 软件对数据统计分析，*代表 P 值≤0.05，**代表 P 值≤0.01，***代表 P 值≤0.001。

3 结果与分析

3.1 HBV_circ_1 改变肝癌细胞 HepG2 的基因表达模式

为全面探讨 HBV_circ_1 的功能和调控机制，对转染 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH-空载 HepG 2 细胞进行 RNA 测序（RNA-seq）。过滤掉低质量的数据后，

在两组细胞中分别共获得 62762232 和 74450816 条读数, 其中 59826594 条和 70850742 条读数可比对到人类基因组上。采用 RPKM 方法计算基因表达量, 将 RPKM 数值等于 1 作为判断基因是否表达的阈值^[2]。在 pLCDH 和 pLCDH-HBV_circ_1 转染细胞中分别检测到 11398 和 11342 个基因表达。进一步分析发现 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 空载体转染细胞间的基因表达模式不同(图 6.1 A, B), 共鉴定出 147 个差异表达显著的基因(改变倍数 ≥ 2.0 , $P < 0.05$) (图 6.1 C, 附表)。其中, 上调表达基因 57 个, 下调表达基因 90 个, 有 29 个差异表达基因只在 pLCDH 空载转染细胞里表达, 有 16 个差异表达基因只在 pLCDH-HBV_circ_1 转染细胞里表达。为验证高通量测序数据的准确性, 随机选择 5 个基因(ATOH 7、MAPK 13、IKBKGP 1、HIST1H4K 和 SPINK 6)利用 real-timePCR 的方法检测其表达水平, 结果显示, real-time PCR 的检测方法与 RNA-seq 的结果基本一致。另外我们还在 HepG 2.2.15 细胞中用 siRNA 干扰 HBV_circ_1 的表达, 检测这 5 个基因的表达, 结果显示基因表达水平变化趋势与过表达 HBV_circ_1 时的相反, (图 6.1 D) 表明 RNA-seq 测序结果可靠。

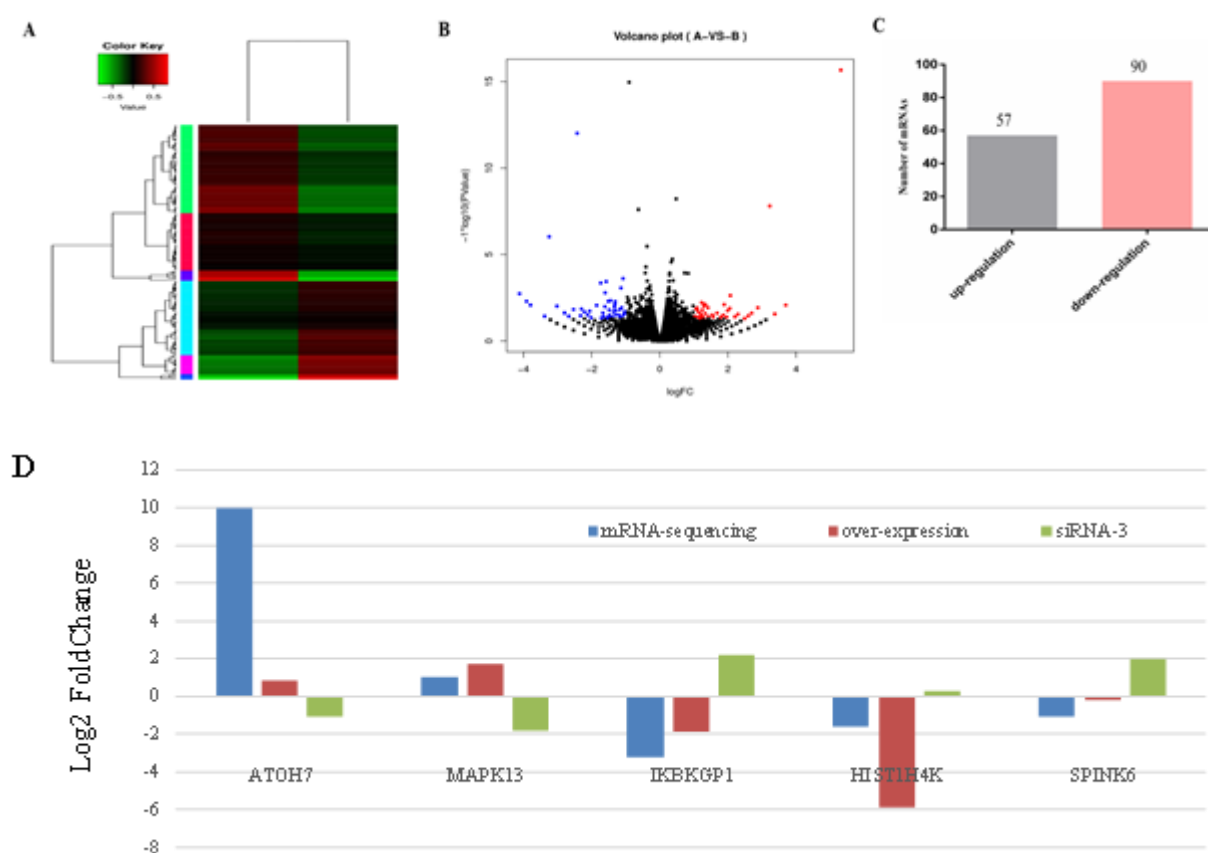


图 6.1 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 转化细胞间的 mRNA 表达模式不同

将 1×10^7 个 HepG 2 细胞接种在直径为 11 cm 的细胞培养皿中培养 24h, 分别转染 10 μ g pLCDH-HBV 和 pLCDH 质粒。48h 后, 将 pLCDH-HBV_circ_1 (样品 B) 和 pLCDH (样品 A) 转化细胞送公司 mRNA 测序。A, 聚类分析热图表示两种转化细胞间差异表达的 mRNA, 红色代表高表达 mRNA, 绿色代表低表达 mRNA。B, 火山图显示 mRNA 的数量和分布。C, 在 pLCDH-HBV_circ_1 转化细胞中上调和下调的 mRNA 个数。D, Real-time PCR 检测 mRNA 的表达。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行 mRNA 表达水平的分析。

Figure 6.1 The mRNA profile of HepG2-pLCDH-HBV_circ_1- and HepG2-pLCDH-transformed cells was different.

1×10^7 HepG 2 cells were seeded in cell culture dish of diameter 11cm and cultured for 24 h. The cells were transfected with 10 μ g pLCDH and pLCDH-HBV_circ_1 plasmid, respectively. HepG2-pLCDH -transformed cells (sample A) and HepG2-pLCDH-HBV_circ_1-transformed cells (sample B) were sent to company for mRNA sequencing. **A.** The clustered heat map showing differentially expressed mRNAs from HepG2-pLCDH-null-transformed cells compared with HepG2-pLCDH-HBV_circ_1-transformed cells. Red indicates high expression mRNAs, green indicates Low expression of mRNA. **B.** Volcano plot shows the number and distribution of mRNAs in the same plane. **C.** The number of upregulated and downregulated mRNAs in HepG2-pLCDH-HBV_circ_1-transformed cells. **D.** Validation of mRNAs expression with real-time PCR. The expression of five mRNAs were analyzed from the mRNA sequencing with real-time PCR. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to normalize the relative gene expression data.

3.2 差异表达基因主要参与的信号通路

为了理解差异表达基因的功能, 对差异表达的基因进行了 GO 富集分析, 结果显示, 差异表达的基因主要富集在了 66 个 GO 条目中 ($P < 0.05$), 包括结合

(binding)、催化活性 (catalytic activity)、转运体活性 (transporter activity)、信号转导活性 (signal transducer activity)、细胞组分 (cell part)、细胞膜组分 (membrane part)、细胞器组分 (organelle)、细胞进程 (cellular process)、生物调节 (biological regulation)、应激反应 (response to stimulus) 和免疫系统过程 (immune system process) 等亚类 (图 6.2 A)。KEGG 通路富集分析了差异基因可能涉及的通路, 图 6.2 B 显示了富集最高的 30 条 KEGG 通路 ($P \leq 0.05$), 包括肿瘤坏死因子信号通路、PIK-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 hippo 信号通路。在 MAPK 信号通路中上调的 CACN 基因能调控细胞增殖, 其他的上调基因 P38 和 Hog1 还能调控细胞周期, 该结果印证了 HBV_circ_1 促进细胞周期、加速细胞增殖的结果。在 PIK-Akt 信号通路中, 上调的基因 ECM 和 ITGA 以及下调基因 GF 均与细胞凋亡和细胞周期进程有关。另外, Hippo 信号通路中 dRASSF 基因的上调也能调控细胞的增殖和凋亡。暗示 HBV_circ_1 也可通过 PIK-Akt 通路、Hippo 通路调节细胞周期, 促进细胞增殖和抑制凋亡。此外, 还有一些差异表达的基因涉及到抗病毒免疫信号通路, 如 RIG-1 类病毒受体信号通路 (RIG-I-like receptor signaling pathway), toll 样受体信号通路 (toll-like receptor signaling) 以及原发性免疫缺陷通路 (primary immunodeficiency) 等 (图 6.2 B)。说明外源性的 circRNA 有可能激活细胞的免疫应答。

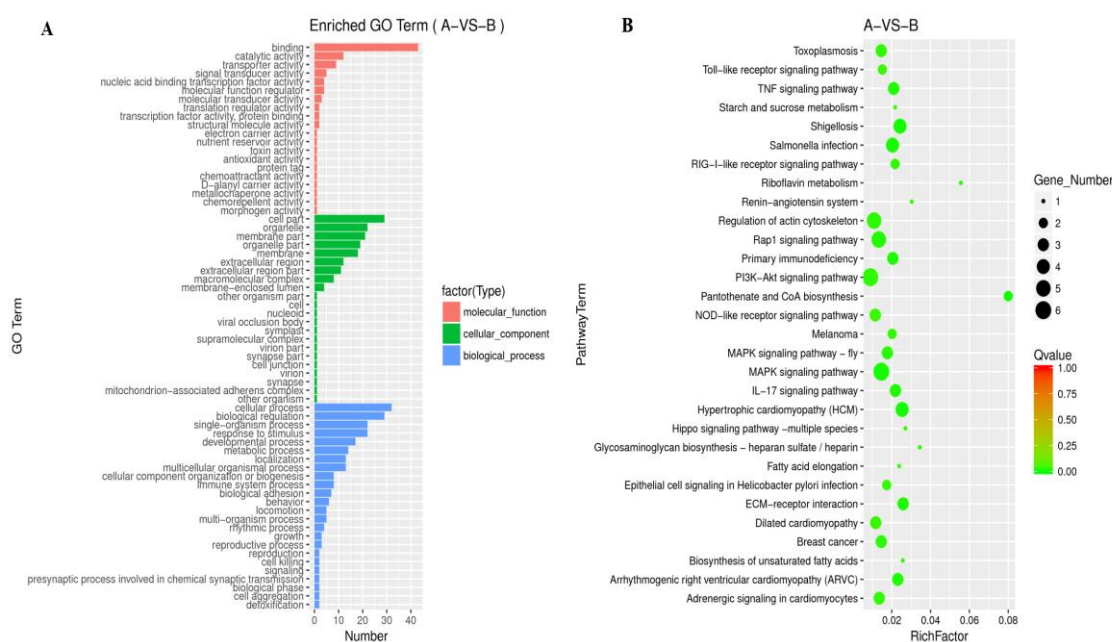


图 6.2 HBV_circ_1 能调控 PIK-Akt、MAPK、Hippo 等信号通路

A, 差异表达基因的 GO 富集分析。y 轴表示 GO 条目, x 轴表示在该 GO 条目中富集的基因个数。B, KEGG 富集分析的前 30 条通路。x 轴表示富集因子, y 轴表示通路名称。点的大小代表在一个通路中富集的基因数量, 而点的颜色代表 Qvalue 范围。

Figure 6.2 PIK-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, Hippo signaling pathway may be regulated by HBV_circ_1.

A. GO function enrichment of dysregulated mRNAs. The y-axis shows the GO term, and the x-axis shows the number of dysregulated mRNAs in the term. **B.** The 30 most enriched KEGG pathways based on dysregulated mRNAs. The x-axis shows the rich factor, and the y-axis shows the pathway names. The point size represents the number of genes enriched in a pathway, and point color represents Qvalue range.

3.3 基因融合事件受 HBV_circ_1 调节

由染色体重排引起的基因融合已被公认为是一种重要的基因组畸变, 并且是致癌的关键驱动因素^[3]。至今为止, 有关 HBV_circ_1 对基因融合的影响还未见报道, 对高通量测序数据进行基因融合分析, 结果显示在转染 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 空载的 HepG 2 细胞中, 基因融合事件存在显著差异。如图 6.3 A 和 B 所示, 在转染 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 空载的 HepG 2 细胞中分别检测到 89 个和 67 个融合基因, 其中 40 个融合基因仅存在于转染 pLCDH-HBV_circ_1 的细胞中(如 *RPS6KB1* 基因与 *VMP1* 基因融合, *RPS6KB1-VMP1*; *CLDN 7* 基因与 *DLG4* 基因融合, *DLG4-CLDN 7*), 18 个融合基因只存在于转染 pLCDH-空载的细胞中。虽然我们还不知道这些融合基因的功能, 但分析单个基因的功能可以提供线索, HBV_circ_1 对基因融合的影响以及这些融合基因的功能还有待需进一步探讨。

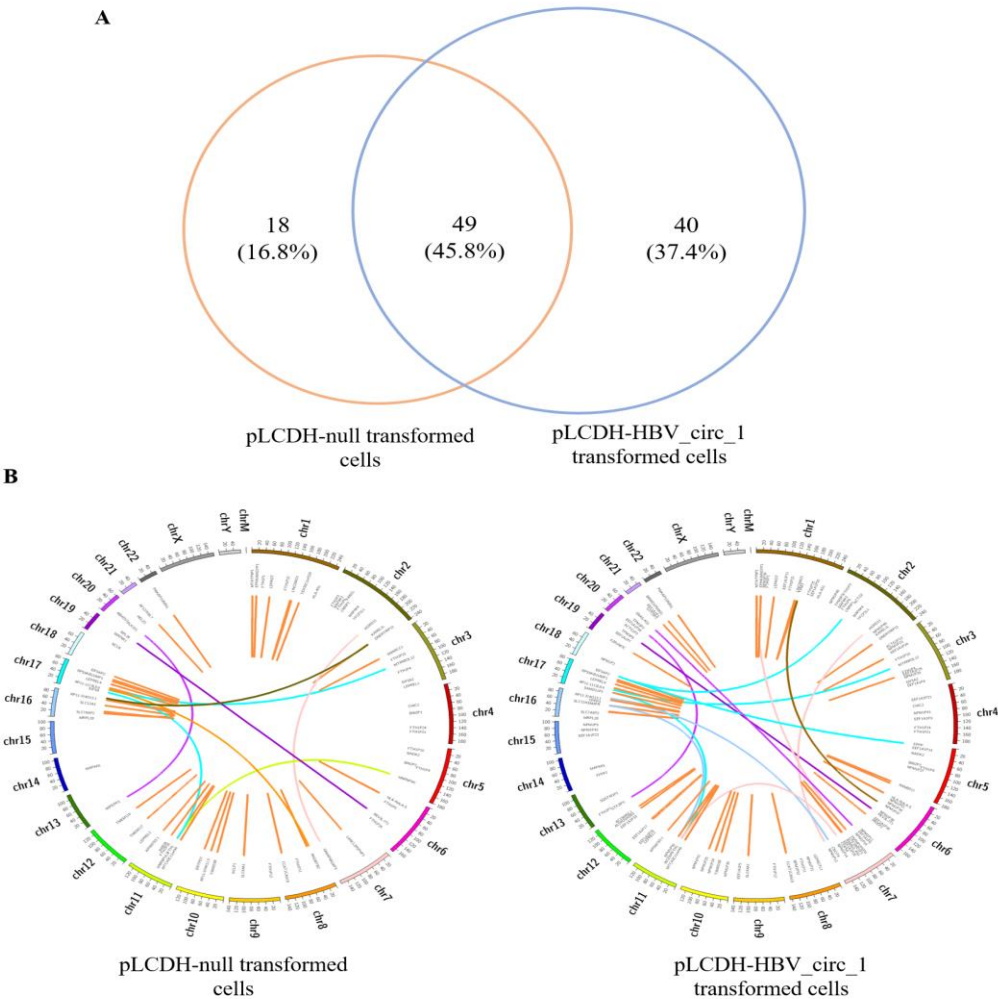


图 6.3 HBV_circ_1 影响 HepG 2 基因的基因融合

A, 在 pLCDH-null 和 pLCDH-HBV_circ_1 转化细胞中的鉴定的融合基因个数。**B**, 融合基因展示。线条表示基因融合事件的发生，而线两端的基因表示发生融合

基因。

Figure 6.3 HBV_circ_1 affects gene fusion of HepG 2 Genes.

A. The number of Genes fusion identified from HepG2-pLCDH-null- and HepG2-pLCDH-HBV_circ_1-transformed cells. **B.** Fusion gene display. Lines indicate the occurrence of a gene fusion event, and the gene at both ends of the line indicates the gene that has fused.

3.4 HBV_circ_1 调节基因可变剪切

可变剪接使一个基因产生多个 mRNA 转录本, 不同 mRNA 可能翻译成不同蛋白。因此, 通过可变剪接一个基因可能产生多个蛋白, 极大地增加了蛋白多样性(Black, 2003; Stamm, 2005; Lareau, 2004)。在前期 HBV_circ_1 的 RNA pull-down 产物的质谱分析中, 我们发现一些候选蛋白与 RNA 剪接相关, 由此猜想 HBV_circ_1 可能会调节基因的可变剪接事件。将 RNA-seq 数据利用软件 rMATS (3.2.5) 软件对可变剪切事件进行差异分析, 结果显示, 过表达 HBV_circ_1 主要引起基因的 3'端可变剪切发生改变, 76 个基因的 3'端可变剪切次数增加, 65 个基因的 3'端可变剪切次数减少。另外有 29 个基因的 5'端可变剪切, 46 个基因的互斥外显子剪切, 35 个基因的保留内含子剪切及 23 个基因的外显子跳跃剪切存在差异(图 6.4)。表明 HBV_circ_1 可能参与调控基因的可变剪切。

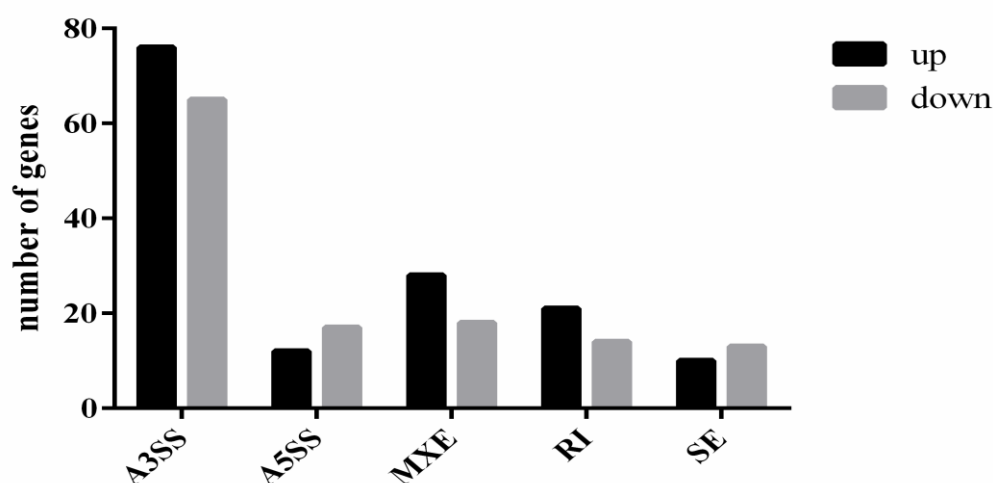


图 6.4 HBV_circ_1 影响 HepG 2 基因的可变剪切

A3SS: 3'端可变剪切 ; A5SS: 5'端可变剪切; MXE:互斥外显子; RI: 保留内含子; SE:外显子跳跃。

Figure 6.4 HBV_circ_1 affects of alternative splicing HepG 2 Genes

A3SS represents 3' splice site; A5SS represents 5' splice site; MXE represents mutually exclusive exons; RI represents retained intron; SE represents skipped exon.

4 讨论

近几年, circRNAs 的功能已经得到了深入研究, 它能参与多种疾病的发生发展^[4]。然而, 关于病毒编码的 circRNA 的功能却鲜有报道。我们的研究发现 HBV 能形成 circRNA, 即 HBV_circ_1。进一步的研究表明 HBV_circ_1 能与 miRNA 及蛋白互作, 另外还发现 HBV_circ_1 能促进 HBV P 基因的表达。然而, HBV_circ_1 还参与哪些信号通路, 还具有哪些未知的功能。本研究通过 RNA-Seq 从全基因组水平研究了 HBV_circ_1 对细胞基因表达模式的影响。结果显示, 由 HBV_circ_1 表达引起差异表达的基因涉及到 PIK-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 Hippo 信号通路等。已有的研究表明 PIK-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 Hippo 信号通路都是与细胞周期、细胞增殖及凋亡有关的重要信号通路^{[5][7]}。上一章的研究结果显示, HBV_circ_1 能影响肝癌细胞的周期进程, 调控细胞增殖和凋亡, 因此我们推测 HBV_circ_1 也可能通过调控 PIK-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 Hippo 信号通路调节肝癌细胞的特征。据报道, HBV 编码的 X 蛋白(HBx)可以调节 ncRNAs 在细胞增殖、凋亡和细胞周期调控中的生物学功能。Lu 等人发现 HBx 能下调 miR-1 的表达水平, 然后激活 PI3K/Akt 信号通路^[8]。此外, miR-216b 可通过 MAPK 信号通路诱导肿瘤细胞增殖, 但 HBx 能抑制 miR-216b 的活性^[9]。HBx 还可以调节 lncRNA, 如 DBH-AS1。DBH-AS1 能通过激活 MAPK 信号通路诱导细胞周期进程^[10]。由于 HBV_circ_1 包含了 HBx 的完整的开放阅读框, 所以我们猜想 HBV_circ_1 也可能通过编码 HBx 蛋白来调控相关的信号通路从而调控细胞周期、细胞增殖等。此外, 差异表达的基因还参与了一些与抗病毒相关的免疫途径(例如 RIG-I 样信号通路)。RIG-I 样信号通路是宿主抗病毒防御系统中的关键通路^{[11][13]}。已有研究证明, 在体外产生的 circRNA 能激活 RIG-I 介导的天然免疫反应, 抵御病毒感染。RIG-I 能识别非我和自我的 circRNA^[14], 我们推测 HBV_circ_1 作为一种来自于病毒编码的外源性 circRNA 能够刺激 RIG-I 信号通路。

基因组的不稳定性会导致融合基因的形成^{[15][17]}。近些年融合基因引起了广泛的关注, 因为它们可能是潜在的肿瘤特异性治疗靶点, 一些融合基因已经在临床上得到了应用, 如 *BCR-ABL*, *EML4-ALK*^[16]。R-spondin 家族的 *RSPO2* 和 *RSPO3* 是在结直肠癌中最常见的融合基因之一, R-spondin 融合可以激活 Wnt 信号, 抑制 *RSPO3* 融合会损害肿瘤的生长^{[18][19]}, 由此可见研究融合基因十分有必要。在本研

究中,在转染 pLCDH-HBV_circ_1 和 pLCDH 空载的 HepG 2 细胞中融合基因存在特异性表达,如融合基因 *DLG4-CLDN 7* 和 *RPS6KB1-VMP1* 只在 pLCDH-HBV_circ_1 过表达的 HepG 2 细胞中特异性表达。虽然我们还不知道这些融合基因的功能,但分析单个基因的功能可以提供线索。据报道,*RPS6KB1* 基因能对 mTOR 信号通路做出应答,进而促进蛋白质合成、细胞生长和细胞增殖,这与人的癌症有关^[20],*CLDN 7* (claudin 7) 基因在不同类型的恶性肿瘤中也有发现^{[21]-[23]}。因此,我们推测融合基因 *DLG4-CLDN 7* 和 *RPS6KB1-VMP1* 在 pLCDH-HBV_circ_1 过表达的 HepG 2 细胞中特异性表达可能与肿瘤有关。

越来越多的证据表明可变剪切在功能多样性和转录调控中起着至关重要的作用,它不仅能增强真核生物蛋白多样性,还能在不改变基因组大小的情况下增加基因组的复杂度^{[24][25]}。在上一章节通过 RN A pull-down 实验我们发现 HBV_circ_1 可能会与剪切相关的蛋白相互作用,如 SRSF1, U2AF35 (表 5.8)。本章 RNA-seq 的结果表明在 HepG2 细胞中过表达 HBV_circ_1 能引起细胞基因可变剪切发生变化,有 141 个基因的 3'端可变剪切受影响发生改变。我们猜想这可能是 HBV_circ_1 与剪接相关的蛋白相互作用的结果。

我们认为 HBV 编码的 circRNA HBV_circ_1 调控细胞周期与细胞增殖是通过与 CDK1、EEF1A1 结合以及提高 CDK1 蛋白稳定性等途径,HBV_circ_1/hsa-miRNA-6124/ST7 互作调控细胞增殖、迁移以及细胞凋亡。HBV_circ_1 还能促进 HBV 的 P 基因表达水平,表明 HBV_circ_1 促进病毒增殖(图 6.5)。这些结果表明 HBV_circ_1 是 HCC 发生和(或)发展的正调控因子,可以作为研究治疗 HCC 以及抗病的药物的靶点。另外,HBV_circ_1 还能调控基因融合事件以及通过与 SRSF1、U2AF35 互作调控可变剪切,但是这些基因融合与可变剪切是否与 HCC 发生和(或)发展相关还需进一步验证。

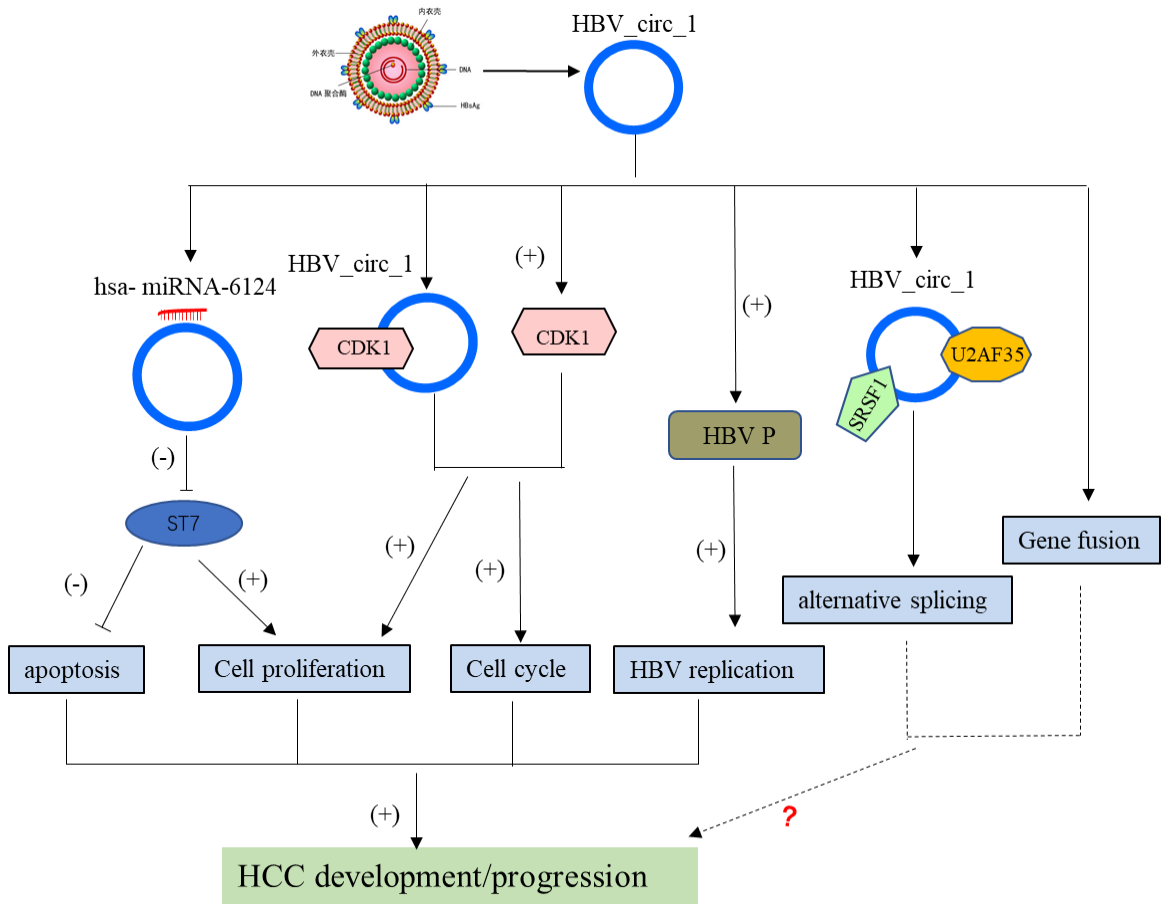


图 6.5 HBV_circ_1 的功能网络图

Figure 6.5 Functional Network Diagram of HBV_circ_1

参考文献

[1] Yang X , Xiong Q , Wu Y , et al. Quantitative Proteomics Reveals the Regulatory Networks of Circular RNA CDR1as in Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, 2017, 16(10).

[2] Fan X, Duan X, Tong Y, et al. The Global Reciprocal Reprogramming between Mycobacteriophage SWU1 and Mycobacterium Reveals the Molecular Strategy of Subversion and Promotion of Phage Infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7.

[3] Mitelman F, Johansson B, Mertens F, The impact of translocations and gene fusions on cancer causation[J]. Nature reviews Cancer,2007, 7:233–245.

[4] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Circular RNAs: Biogenesis, Function, and a Role as Possible Cancer Biomarkers[J]. Int J Genomics, 2017:6218353.

- [5] King D, Yeomanson D, Bryant HE. PI3King the Lock: Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroblastoma[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2015, 37: 245–251.
- [6] Meloche, Pouysségur J. The ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway as a Master Regulator of the G1- to S-Phase Transition[J]. Oncogene, 2007, 26:3227–3239.
- [7] Saucedo LJ, Edgar BA. Filling out the Hippo pathway[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8: 613–621.
- [8] Lu JW, Liao CY, Yang WY, et al. Overexpression of endothelin 1 triggers hepatocarcinogenesis in zebrafish and promotes cell proliferation and migration through the AKT pathway[J]. PLoS One, 2014, 9: e85318.
- [9] Liu F Y , Zhou S J , Deng Y L , et al. MiR-216b is involved in pathogenesis and progression of hepatocellular carcinoma through HBx-miR-216b-IGF2BP2 signaling pathway[J]. Cell Death and Disease, 2015, 6(3):e1670.
- [10]Huang J L , Ren T Y , Cao S W , et al. HBx-related long non-coding RNA DBH-AS1 promotes cell proliferation and survival by activating MAPK signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(32):33791-33804.
- [11]Yoneyama M , Kikuchi M , Natsukawa T , et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses[J]. Nature Immunology, 2004, 5(7):730-737.
- [12]Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20:17-22.
- [13]Nakhaei P, Genin P, Civas A, et al. RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection[J]. Semin Immunol, 2009, 21:215-222.
- [14]Chen Y G , Kim M V , Chen X , et al. Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity[J]. Molecular Cell, 2017:S1097276517303623.
- [15]Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find[J]. Genome Med , 2015, 7:129.
- [16]Mertens F, Johansson B, Fioretos T, et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15:371–81.
- [17]Stransky N, Cerami E, Schalm S, et al. The landscape of kinase fusions in cancer [J]. Nat Commun, 2014, 5:4846.
- [18]Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon

- cancer [J]. Nature 2012,488:660–664.
- [19]Storm EE, Durinck S, de Sousa e Melo F, et al. Targeting PTPRK-RSPO3 colon tumours promotes differentiation and loss of stem-cell function [J]. Nature, 2016, 529:97–100.
- [20]Lee JE, Lim MS, Park JH, et al. S6K Promotes Dopaminergic Neuronal Differentiation Through PI3K/Akt/mTOR-Dependent Signaling Pathways in Human Neural Stem Cells[J]. Mol Neurobiol,2016, 53:3771-3782.
- [21]Wang Y, Mei H, Shao Q, et al. Association of ribosomal protein S6 kinase 1 with cellular radiosensitivity of non-small lung cancer [J]. Int J Radiat Biol, 2017, 93:581-589.
- [22]Philip R , Heiler S , Mu W , et al. Claudin-7 promotes the epithelial – mesenchymal transition in human colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(4):2046-2063.
- [23]Lu Z, Kim DH, Fan J, et al. A non-tight junction function of claudin-7-Interaction with integrin signaling in suppressing lung cancer cell proliferation and detachment[J]. Mol Cancer 14:120.
- [24]Ruan J, Guo F, Wang Y, et al. Transcriptome analysis of alternative splicing in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. BMC Plant Biol,2018, 18:139
- [25]Thatcher SR, Zhou W, Leonard A, et al. Genome-wide analysis of alternative splicing in *Zea mays*: landscape and genetic regulation [J]. Plant Cell,2014, 26:3472–3487

第七章 结论与创新点

总结论

1. 在细胞和组织水平证明了 HBV 能借助宿主的剪接系统产生 HBV_circ_1;
2. HBV_circ_1 能促进细胞增殖、迁移,抑制凋亡,还能调控细胞周期。
3. HBV_circ_1 能与 miRNA-6124、miRNA-194 结合,并调控 miRNA-6124 的靶基因 ST7 表达
4. HBV_circ_1 能与蛋白 CDK1、EEF1A 互作
5. HBV_circ_1 能改变肝癌细胞 HepG 2 的基因表达模式

创新点

近年来关于circRNA在肝癌、结肠癌、膀胱癌、鳞状细胞癌和食道癌等疾病中调控作用的报道推测circRNA在肿瘤的发生发展中扮演重要角色。本研究率先发现HBV可以产生功能性HBV_circ_1,并证实HBV_circ_1通过HBV_circ_1-miRNA-6124-ST7网络、通过与CDK1、EEF1A互作以及改细胞基因的表达模式等促进肝癌细胞增殖、迁移,抑制凋亡,在HBV相关肝癌发生和/或发展中发挥重要功能。HBV_circ_1有可能作为治疗HBV感染的重要分子靶标。

附录一

缩略词表

缩 写	英文名称或学名
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
mRNA	Messenger RNA
miRNA	Micro RNA
circRNAs	Circular RNAs
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
FBS	Fetal bovine serum
GO	Gene Ontology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
pvalue	Probability value
RNAi	RNA interference
RNA-seq	RNA sequencing
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
UTR	Untranslated region
HBV	Hepatitis B virus
RBP	RNA binding protein
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3
MBL	muscleblind
EIF3J	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J
U1 snRNP	small ribonucleoprotein particle U1 subunit
ITCH	Itchy E3 ubiquitin protein ligase
Foxo3	Forkhead box O3
CDK2	Cyclin dependent kinase 2
MDM2	MDM2 proto-oncogene
Puma	BCL2 binding component 3
IRES	Internal ribosome entry site
USP28	Ubiquitin specific peptidase 28
FBXW 7	F-box and WD repeat domain containing 7
SHPRH	SNF2 histone linker PHD RING helicase
DTL	Denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
LINC-PINT	Long intergenic non-protein coding RNA, p53 induced transcript
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4
ALK	Anaplastic lymphoma kinase

HCC	Hepatocarcinoma
ZKSCAN1	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
U2AF65	U2AF large subunit
EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A3
UPF1	regulator of nonsense transcripts
AR	androgen receptor
ADAR1	adenosine deaminase RNA specific
PABPC1	poly(A) binding protein cytoplasmic 1
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
SETDB1	SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1
pgRNA	pre-genomic RNA
cccDNA	covalently closed circularDNA
lncRNA	long non-coding
RIP	RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay
CDK1	cyclin-dependent kinases 1
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1
ST7	suppression of tumorigenicity 7
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
ATOH7	atonal bHLH transcription factor 7
MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13
IKBKGP1	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit gamma pseudogene 1
HIST1H4K	histone cluster 1 H4 family member k
SPINK6	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6

附录二

实验室常用仪器

仪器名称	型号	生产公司
PCR 仪	TP600	日本 TaKaRa 公司
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD CFX 96	美国 BIO-RAD 公司
1/10000 分析天平	BS124S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
超声清洗器	KQ500-DB	昆山市超声仪器有限公司
pH 计	Delta320	梅特勒-托利多仪器有限公司
加热搅拌仪	78-1	金坛市荣华仪器有限公司
微型漩涡混匀仪	XW-80A	上海沪西分析仪器厂
旋转混合仪	DH- II	宁海新芝公司
恒温金属浴	CHB-10	杭州大和热磁电子有限公司
台式冷冻离心机	5427R	德国 Eppendorf 公司
台式空气恒温振荡仪	QYC200	上海福玛实验设备有限公司
紫外透射分析仪	KH-UVI 型	上海康禾光电仪器有限公司
核酸电泳仪	DY-A	上海西巴斯生物技术有限公司
凝胶成像系统	UniversalHoodII	美国 Bio-Rad 公司
水平电泳槽	—	天能公司
垂直电泳槽	Mini Protean 3 Cel	美国 BioRad 公司
超低温冰箱	705	美国 Forma 公司
多功能检测仪	GloMax Muti Jr	美国 Promega 公司
有谱超纯水仪	UPT-III-5T	成都超纯科技有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	MLS-3751L-PC	日本 Panasonic 公司
荧光正置显微镜	Leicadm2000 led	德国莱卡公司
荧光倒置显微镜	Nikon TE2000-U	日本 Nikon 公司
流式细胞检测仪	CoulterFC500	美国 Beckman 公司
烘箱	CS101	重庆四达实验仪器有限公司

附录三

HBV_circ_1 序列

GATCCTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCC
CTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTC
GGAAAATTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGT
GGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCT
GTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACC
CTAACAAAACAAAGAGATGGGGTACTCTCTAAATTTTATGGGTATGTCATTGGATGTTATGGGTCCTT
GCCACAAGAACACATCATACAAAAAATCAAAGAATGTTTTAGAAAACCTCCTATTAACAGGCCTATTGAT
TGGAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGTCTTGCTGCCCCCTTTACACAATGTGGTTATCCTG
CGTTGATGCCTTTGTATGCATGTATTCAATCTAAGCAGGCTTTCACCTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTT
TCTGTGTAAACAATACCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGCCAAGTGTTCGT
GACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTTCGGCTCCTC
TGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTATCGG
GACTGATAACTCTGTTGTCCTATCCCGCAAATATACATCGTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAAC
TGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCTGCGGACGACCCTTCTCGGG
GTCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTA
CGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCA
TGGAGACCACCGTGAACGCCCACCAAATATTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGC
AATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAG
GAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCA
ACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGG
TGGCTTTGGGGCATGGACATCGACCCCTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGC
CTTCTGACTTCTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAGCCTTAGA
GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCTTTGCTGGGGGGAACATAATG
ACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCGTCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCA
ACACTAATATGGGCCTAAAGTTCAGGCAACTCTTGTGGTTTCACATTTCTTGTCTCACTTTTGAAGAGA

AACAGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAT
GCCCCTATCCTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAA
CTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTCGCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATG
T TAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGGAACCTTACTGGGCTTTATTCTTCTACTGTACCTGTCTTTAA
TCCTCATTGGAAAACACCATCTTTTCCTAATATACATTTACACCAAGACATTATCAAAAAATGTGAACAG
TTTGTAGGCCCACTCACAGTTAATGAGAAAAGAAGATTGCAATTGATTATGCCTGCCAGGTTTTATCCAA
AGGTTACCAAATATTTACCATTGGATAAGGGTATTAAACCTTATTATCCAGAACATCTAGTTAATCATT
CTTCCAAACTAGACACTATTTACACACTCTATGGAAGGCGGGTATATTATATAAGAGAGAAACAACACAT
AGCGCCTCATTTTGTGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGATCTACAGCATGGGGCAGAATCTTTCCACC
AGCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGACCACCAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAACACCGCAAATCCAG
ATTGGGACTTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAG

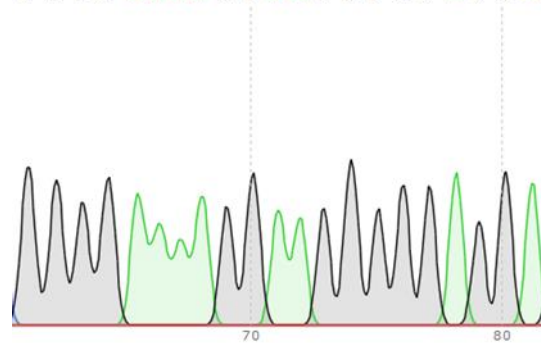
附录四 RNA pull-down 产物 miRNA 测序及蛋白质质谱

一、miRNA 测序

hsa-miR-6124 MIMAT0024597

GGGAAAAGGAAGGGGGAGGA

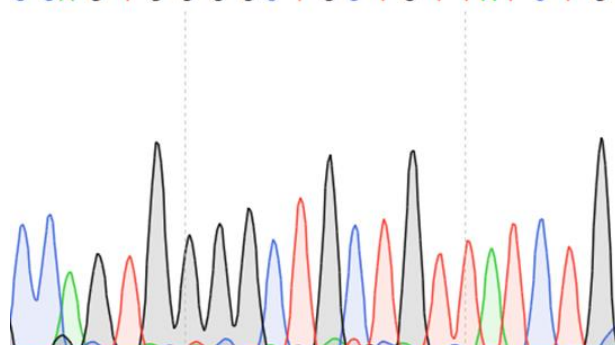
G G G G A A A G G A G G G G G A G G A



hsa-miR-194-3p MIMAT0004671

CCAGUGGGGCUGCUGUUAUCUG

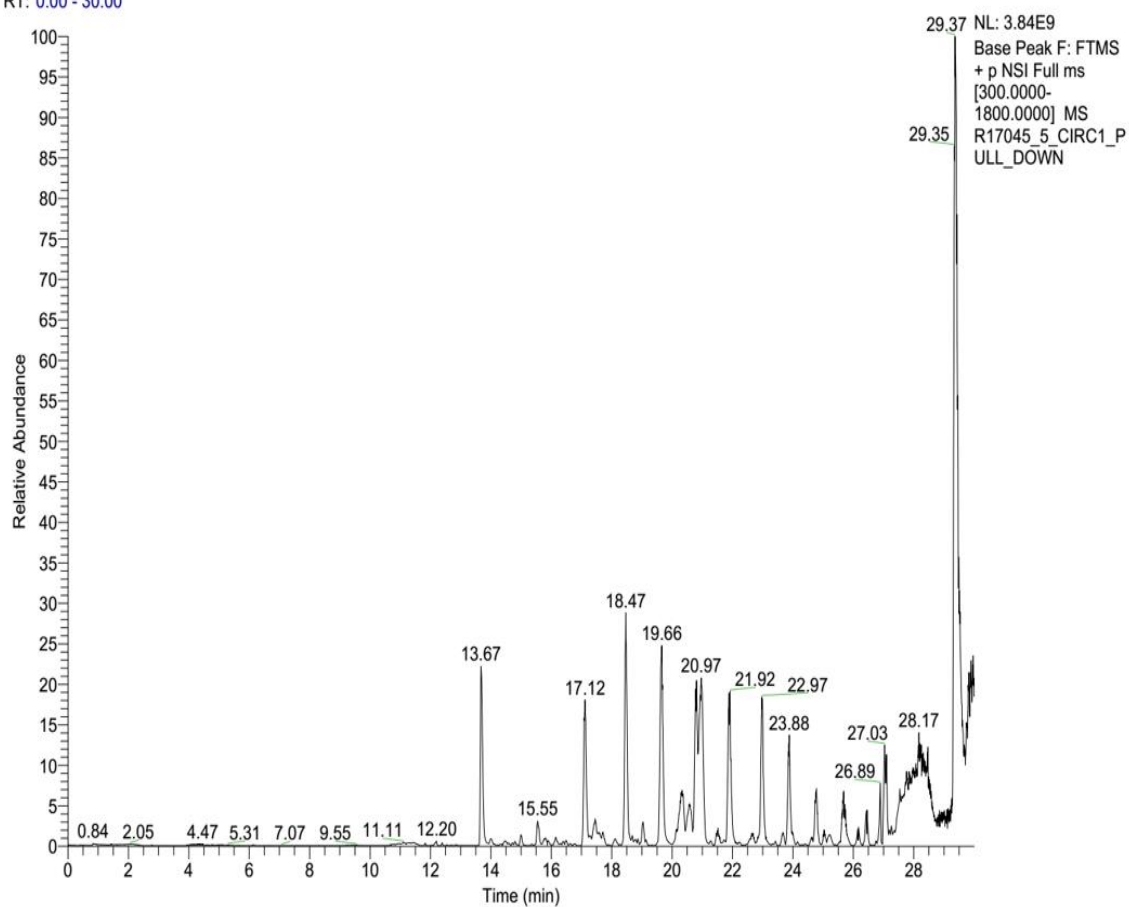
C C A G T G G G G C T G C T G T T A T C T G



二、质谱

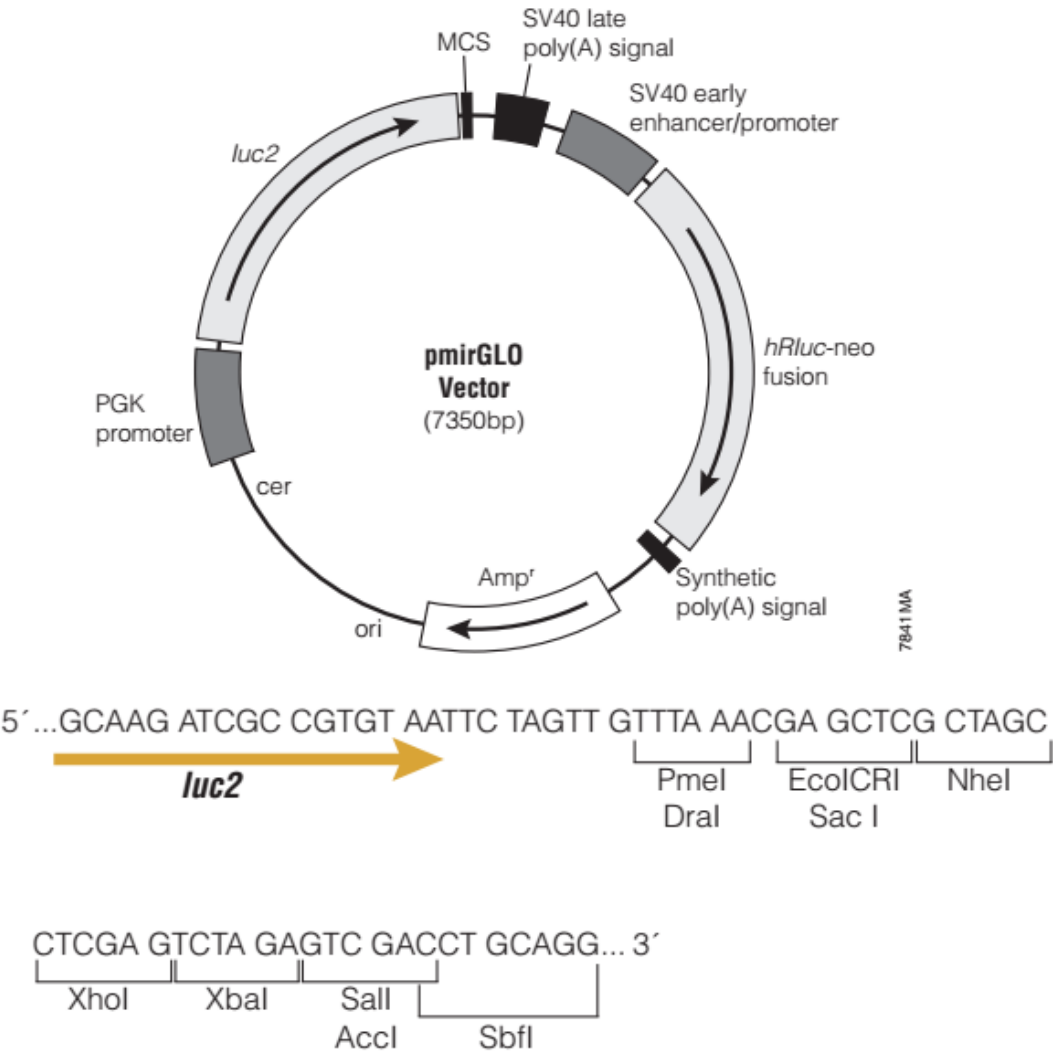
R17045_5_CIRC1_PULL_DOWN

RT: 0.00 - 30.00

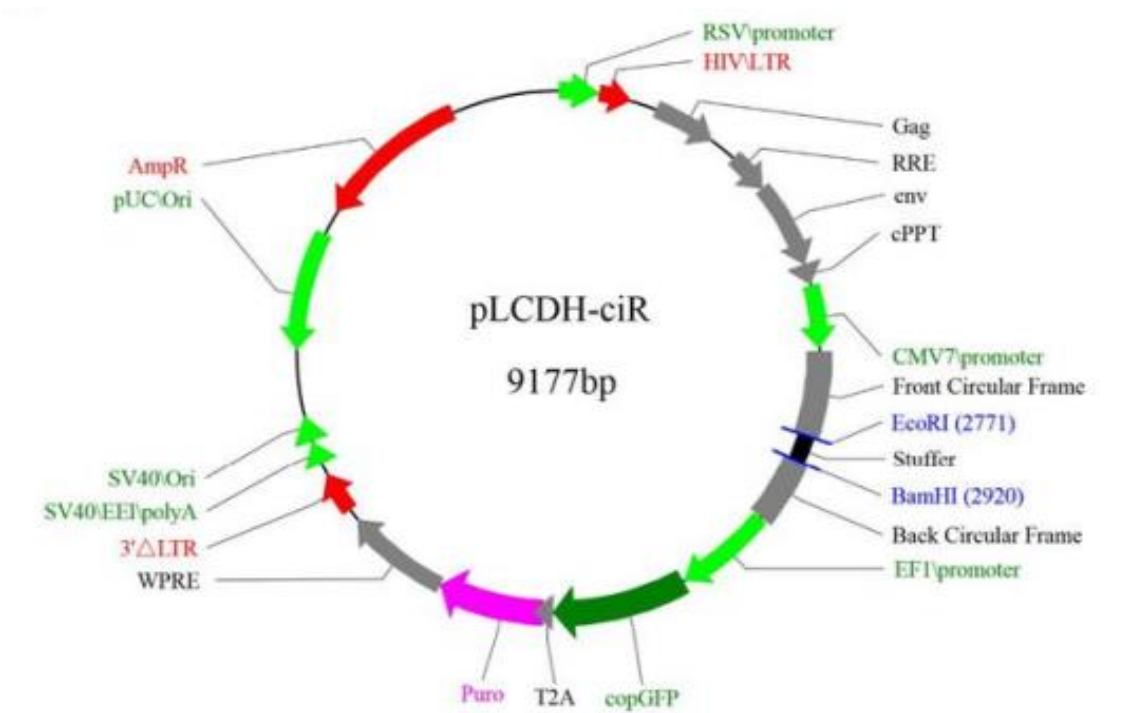


附录五 载体图谱

1. pmirGLO 载体图谱



2. pLCDH-ciR 载体图谱



附录六 原始数据

附表 1. 验证全转录组测序数据 (mRNA)

基因名称	Sequencing in HepG2.2.15 (log2foldchange)	Real-time PCR in HepG2.2.15 (log2foldchange)	Real-time PCR in HCC tissue (log2foldchange)
myc	1.567000	5.260000	2.700000
exosc4	2.020000	2.460000	1.220000
zscan22	1.100000	1.430000	4.100000
znf775	1.300000	0.5199997	0.5299998
gbx2	-4.800000	1.220000	-3.919992
hoxd1	-2.540000	-1.430000	0.2999995
neu4	0.350000	-3.710000	-3.530006

附表 2. 验证全转录组测序数据 (circRNA)

基因名称	Sequencing in HepG2.2.15 (log2foldchange)	Real-time PCR in HepG2.2.15 (log2foldchange)	Real-time PCR in HCC tissue (log2foldchange)
Circ_CREBBP	0.6940395	-1.393802	4.271335
Circ_RAB3IP	0.5512483	-0.7157422	-7.934790
Circ_RNF220	2.788299	2.555052	-3.738300
Circ_GTDC1	-6.751069	-6.342222	3.338870
Circ_PDE8A	-0.2943003	-1.580663	0.408232
chr14:40124049-40125012	6.388204	3.830658	-0.290340

附表 3. HBV_circ_1 过表达检测

细胞	Actin CT 值	HBV_circ_1 CT 值	2-ΔΔCt
pLCDH-HBV_circ_1(0.5)	15.2515.5115.47	29.2329.5229.68	1
pLCDH-HBV_circ_1(0.5)	16.3816.4316.36	28.2028.9028.51	3.09
pLCDH-HBV_circ_1(1)	15.0614.9614.81	26.8527.0927.19	1
pLCDH-HBV_circ_1(1)	16.0616.4716.38	26.9926.8726.75	3.36

附表 4. CDK1 western 灰度值原始数据

细胞	CDK1 灰度值	Tubulin 灰度值	CDK1/Tubulin
pLCDH	9410.74	13367.33	0.704011
pLCDH	23088	27578.92	0.837161
pLCDH-HBV_circ_1	24201.95	22624.26	1.069735
pLCDH-HBV_circ_1	10933.376	9628.548	1.135516591

在校期间发表论文情况

1. **Zhu M**, Xiaolong Hu, et al. Functional characterization of BmOVOS in silkworm, *Bombyx mori*. BMC Genomics. 2019;20(1):342.
2. Hu X, **Zhu M**, et al. Circular RNA alterations in the Bombyx mori midgut following *B. mori* nucleopolyhedrovirus infection. Mol Immunol. 2018; 101:461-470.
(共一)
3. Hu X, **Zhu M**, et al. Identification and characterization of circular RNAs in the silkworm midgut following *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus infection. RNA Biol. 2018 Feb 1;15(2):292-301. (共一)
4. **Zhu M**, Hu X, et al. Functions and impact of tal-like genes in animals with regard to applied aspects. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Jun 16.
5. Zhang X, **Zhu M**, Hu X. Integrated miRNA and mRNA expression profiling to identify mRNA targets of dysregulated miRNAs in pulmonary tuberculosis. Epigenomics. 2018 Aug;10(8):1051-1069.
6. Zhang X, **Zhu M**, et al. Identification and comparison of novel circular RNAs with associated co-expression and competing endogenous RNA networks in pulmonary tuberculosis. Oncotarget. 2017 Nov 27;8(69):113571-113582. (共一)
7. Cao G, Gong Y, Hu X, **Zhu M**, et al. Identification of tarsal-less peptides from the silkworm *Bombyx mori*. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Feb;102(4):1809-1822.
8. He L, Hu X, **Zhu M**, et al. Identification and characterization of vp7 gene in Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus. Gene. 2017 Sep 5; 627:343-350.
9. Hu X, **Zhu M**, et al. Proteomic analysis of BmN cell lipid rafts reveals roles in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection. Mol Genet Genomics. 2017 ,292(2):465-474. (共一)
10. Hu X, **Zhu M**, et al. Proteomics analysis of digestive juice from silkworm during Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection. Proteomics. 2015 Aug;15(15):2691-700. (共一)
11. **Zhu M**, Liu B, et al. Identification and rapid diagnosis of the pathogen responsible for haemorrhagic disease of the gill of Allogynogenetic crucian carp. J Virol Methods. 2015 Jul; 219:67-74.

12. **Zhu M**, Li K et al. Host range and vertical transmission of Cyprinid herpesvirus 2. (**Accept, Turkish Journal of Fisheries and Aquaticsciences**).
13. **Zhu M**, Xiaolong Hu, et al. Small peptide encoded by the vicircRNA_0048 derived from *Bombyx mori* Cypovirus 1 suppresses viral replication. (**Under review, Journal of virology**).
14. **Zhu M**, Xiaolong et al. Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in HBV-positive cells. (**Under review, Scientific reports**).

致 谢

李白在《春夜宴从弟桃花园序》中曾对时间的飞逝有过慨叹：“夫天地者，万物之逆旅也；光阴者，百代之过客。”时间流淌在我们身上，而我们大多时候却是毫无所知。它太急了，以至于我仍无法置信于毕业已近在眼前。于我而言，在苏大的这十年，是我人生之旅中最值得标注的一程。辞别了淮安赶赴姑苏，地点变更出的是青春不悔的颜色；是学士服中无数次辛苦诵书时的黑夜，也是硕士服里暗藏着的实验间歇时抬头所瞥见的一角蓝天，更是博士服外那抹临摹自早起时迎起的初日的深红。

浮生果真若梦。在这十年里，我曾饱饮过苏城的雨雪，也沉醉过炳麟的闭馆音乐。但每次皆如初见般；每次，校园总会新鲜我的感观。在这几年里，一些人接替另一些人的出场，在我的求学途中扮演了诸多的故事。我很感谢他们。现在，人生的漫漫前路尽管未定，但我唯一能确定的是：离开并非结束，它只是新旅程的开始。时光太瘦而我们的指缝太宽，或许只有在离别的时候才更能体会时光的匆匆流逝，三年的博士学习生活匆匆而逝，纵然心中有万千不舍，但终须要说再见。在这毕业之际，我要深深地感谢三年来一路相伴的老师，同学，朋友和家人。

首先，我要感谢我的导师贡成良教授。不仅感谢您对我的毕业论文的悉心指导，还要感谢您在博士三年期间对我的教育和鼓励。三年来我从您身上学到了许多做人做事的道理，知道了做人要谦逊，做科研要严谨、实事求是。每一次经过办公室，总能看到您伏首案前工作的背影，从您身上我们看到了什么叫专注，什么叫坚持，什么叫高效率。与您的每一次交谈都被您身上的大智慧折服，还记得您曾说过人生如果能做好三件事的话，那么这个人一定不会差。一是锻炼身体，

二是不断学习，三是照顾好家人。短短的十三个字却包含了我们应该有的一种人生态度与追求。何其幸运，能够师从您，我会谨记您的每一次教诲，希望自己能像您一样行走在未来的道路上。同时我还要感谢实验室薛仁宇老师、曹广力老师、胡小龙老师和冯永杰老师在科研，学习和生活等各个方面给予的殷切关怀和不遗余力地帮助和指导，在此谨向各位老师表示最崇高的敬意和最诚挚的感谢。

感谢朝夕相伴的师弟师妹们，跟你们在一起学习生活似乎永远感觉不到“岁月是把杀猪刀”，你们是那么的充满活力，那么的想法新奇，与你们在一起感觉自己好像一直很年轻（PS：虽然自己已然快到了三十而立的年龄）。感谢跟我同时毕业的硕士师弟师妹们，感谢这三年里我们一起并肩作战的时光，这应该是我们彼此人生中最美好的时光。时光的河入海流，如今我们终于分头走，只愿各位前程似锦。

感谢呵护我成长的父母。每当我遇到挫折困难的时候，你们总是第一个给予我鼓励。你们的一通电话，一声关切的鼓励就会让我拥有继续前行的力量。回顾近 30 年来走过的道路，每一步都浸满了你们无私的关爱和谆谆教诲。人生的每一个阶段只要我需要你们就一定在身后支持我，直至我成家之后你们亦是如此。你们在精神上和物质上的无私支持，坚定了我追求人生理想的信念。你们的爱让我明白父母的爱是天下最无私的最宽厚的爱。大恩无以言报，惟有永无止境的奋斗。感谢徐乐先森对我的包容与理解，包容我偶尔的任性，包容我的小脾气，感谢他在我困惑迷茫时给予的鼓励与支持。感谢姐姐对我的无条件支持，感谢小依依在小姨繁重的科研学习中给小姨带来的诸多快乐。在小姨的熏陶下，小小年纪就要做实验当科学家，小姨怎么都觉得带你入了个坑（偷笑）。最后还要感谢我的发际线，感谢在我写完博士论文后你还坚守在原地。

最后，谨向参加论文评阅和答辩的全体专家致以最诚挚的谢意！

朱敏

2019. 5 29 于独墅湖畔