



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: TNF- α 调控的 circWBSCR22 通过 miR-512-5p/FAM60A 轴对宫颈癌细胞迁移、侵袭的影响

作者: 白丽丽, 张瑾, 樊亚童, 张鹏宇

网络首发日期: 2026-03-12

引用格式: 白丽丽, 张瑾, 樊亚童, 张鹏宇. TNF- α 调控的 circWBSCR22 通过 miR-512-5p/FAM60A 轴对宫颈癌细胞迁移、侵袭的影响[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260312.1007.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

TNF- α 调控的 circWBSCR22 通过 miR-512-5p/FAM60A 轴对宫颈癌细胞迁移、侵袭的影响

白丽丽^{1,2,3,4}, 张瑾⁵, 樊亚童^{1,2,3,4}, 张鹏宇^{1,2,3,4}

(¹天津医科大学肿瘤医院输血科, 天津 300202; ²恶性肿瘤国家临床医学研究中心, 天津 300202; ³天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300202; ⁴天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300202; ⁵天津医科大学研究生院, 天津 300202)

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 调控的环状 RNA Williams Beuren 综合征染色体区域 22 (circWBSCR22) 对宫颈癌细胞恶性行为的影响及机制。**方法** TNF- α 处理人宫颈癌 HeLa 细胞。逆转录定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测 circWBSCR22 表达水平。核质 RNA 分离实验检测 circWBSCR22 在细胞中定位。分别通过 Transwell 实验、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 实验、克隆形成实验检测细胞迁移、细胞侵袭、细胞活性和细胞增殖能力。双荧光素酶报告基因实验验证微小 RNA-512-5p (miR-512-5p) 与 circWBSCR22 或序列相似性家族 60A (FAM60A) 的靶定关系。RT-qPCR 检测 miR-512-5p 和 FAM60A RNA 水平。Western blot 检测 FAM60A 蛋白水平。**结果** 相比于 Control 组, TNF- α 处理后 HeLa 细胞中 circWBSCR22 表达水平升高 ($P < 0.05$)。大约 66% 的 circWBSCR22 存在于细胞质中。相比于对照组, 转染 circWBSCR22 后 HeLa 细胞的迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.01$) 能力增强, 但细胞活性和细胞增殖能力无明显影响 ($P > 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示: 与共转染 circWBSCR22-WT 和 miR-NC 组相比, 共转染 circWBSCR22-WT 和 miR-512-5p 组相对荧光素活性降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 转染 circWBSCR22 后 HeLa 细胞中 miR-512-5p 表达水平降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 转染 miR-512-5p 后宫颈癌 HeLa 细胞迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.05$) 能力下降。双荧光素酶报告基因实验显示: 与共转染 FAM60A 3'-UTR-WT 和 miR-NC 组相比, 共转染 FAM60A 3'-UTR-WT 与 miR-512-5p 组荧光活性下降 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 转染 miR-512-5p 后 HeLa 细胞中 FAM60A 的 RNA ($P < 0.05$) 和蛋白 ($P < 0.01$) 表达水平降低。相比于对照组, 转染 FAM60A 后宫颈癌 HeLa 细胞迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82300944); 天津市医学重点学科建设资助项目 (编号: TJYXZDXK-3-003A); 天津医科大学肿瘤医院院级科学研究资助基金项目 (编号: Y1905)

作者简介: 白丽丽, 女, 硕士研究生;

张鹏宇, 男, 博士, 主任技师, 通信作者, E-mail: pzhang@tmu.edu.cn

($P < 0.01$)能力增强。与对照组相比,转染 circWBSCR22 后,细胞中 FAM60A RNA($P < 0.01$)和蛋白($P < 0.05$)表达水平升高。挽救实验结果显示:相比于 pcDNA+miR-NC 组,pcDNA+miR-512-5p 组 FAM60A RNA($P < 0.01$)和蛋白($P < 0.001$)表达水平降低且迁移($P < 0.01$)和侵袭($P < 0.05$)能力降低;与 pcDNA+miR-512-5p 组相比,circWBSCR22+miR-512-5p 组 FAM60A RNA($P < 0.01$)和蛋白($P < 0.001$)表达水平升高且迁移($P < 0.01$)和侵袭($P < 0.05$)能力增强。**结论** TNF- α 通过 circWBSCR22/miR-512-5p/FAM60A 调控轴促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭。

关键词 宫颈癌; TNF- α ; circWBSCR22; miR-512-5p; FAM60A; 迁移; 侵袭

中图分类号 R737.33

文献标识码 A

The effect of TNF- α -regulated circWBSCR22 on the migration and invasion of cervical cancer cells through the miR-512-5p/FAM60A axis

Bai Lili^{1,2,3,4}, Zhang Jin⁵, Fan Yatong^{1,2,3,4}, Zhang Pengyu^{1,2,3,4}

(¹Dept of Blood Transfusion, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, Tianjin 300202; ²National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300202; ³Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300202; ⁴Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300202; ⁵Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300202)

Abstract **Objective** To explore the effect and mechanism of tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-regulated circular RNA Williams Beuren syndrome chromosomal region 22 (circWBSCR22) on the malignant behaviors of cervical cancer cells. **Methods** Human cervical cancer HeLa cells were treated with TNF- α . Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression level of circWBSCR22. Nuclear-cytoplasmic RNA separation experiments were conducted to determine the localization of circWBSCR22 in cells. Cell migration, invasion, viability, and proliferation were assessed through Transwell assay, tetrazolium salt (MTT) assay, and colony formation assay, respectively. Dual-luciferase reporter gene assays were performed to verify the targeting relationship between microRNA-512-5p (miR-512-5p) and circWBSCR22 or family with sequence similarity 60A (FAM60A). RT-qPCR was used to detect the RNA levels of miR-512-5p and FAM60A. Western blot was used to detect the protein level of FAM60A. **Results** Compared with the Control group,

the expression level of circWBSCR22 in HeLa cells treated with TNF- α increased ($P<0.05$). About 66% of circWBSCR22 was found in the cytoplasm. Compared with the control group, the migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.01$) of HeLa cells transfected with circWBSCR22 were enhanced, but the cell activity and cell proliferation were not significantly affected ($P>0.05$). The double luciferase reporter gene assay showed that the relative luciferase activity of the co transfected circWBSCR22-WT and miR-512-5p groups was lower than that of the co transfected circWBSCR22-WT and miR-NC groups ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression level of miR-512-5p in HeLa cells transfected with circWBSCR22 decreased ($P<0.01$). Compared with the control group, the migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.05$) ability of HeLa cells transfected with miR-512-5p decreased. Double luciferase reporter gene assay showed that compared with the co transfected FAM60A 3'-UTR-WT and miR-NC groups, the fluorescence activity of the co transfected FAM60A 3'-UTR-WT and miR-512-5p groups decreased ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression levels of FAM60A mRNA ($P<0.05$) and protein ($P<0.01$) in HeLa cells transfected with miR-512-5p decreased. Compared with the control group, the migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.01$) of cervical cancer HeLa cells transfected with FAM60A were enhanced. Compared with the control group, the expression levels of FAM60A mRNA ($P<0.01$) and protein ($P<0.05$) in the cells transfected with circWBSCR22 increased. The results of rescue experiment showed that compared with the pcDNA+miR-NC group, the expression levels of FAM60A RNA ($P<0.01$) and protein ($P<0.001$) in the pcDNA+miR-512-5p group decreased, and the ability of migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.05$) decreased; Compared with pcDNA+miR-512-5p group, the expression levels of FAM60A RNA ($P<0.01$) and protein ($P<0.001$) in circWBSCR22+miR-512-5p group increased, and the ability of migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.05$) was enhanced. **Conclusion** TNF- α promotes the migration and invasion of cervical cancer cells through the circWBSCR22/miR-512-5p/FAM60A regulatory axis.

Key words cervical cancer; TNF- α ; circWBSCR22; miR-512-5p; FAM60A; migration; invasion

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82300944); Tianjin Medical Key Discipline Construction Fund (No. TJYXZDXK-3-003A); Tianjin Medical University Institute & Hospital Scientific Research Fund (No. Y1905)

Corresponding author Zhang Pengyu, E-mail: pzhang@tmu.edu.cn

宫颈癌是女性癌症相关死亡的第四大原因，2022 年全球统计数据表明全世界新增病例 661 021 例，死亡病例 348 189 例^[1]。高危型 HPV 持续感染是宫颈癌发病的常见原因，感染过程中通常会激活白细胞介素和干扰素等炎症因子。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 作为一种核心炎症介质，参与肿瘤免疫微环境的形成，影响肿瘤细胞存活、血管生成及免疫逃逸等恶性行为^[2]。

环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 是一类共价闭合环状非编码 RNA，既不含 3' 和 5' 末端，也没有 polyA 尾结构，比线性 RNA 更加耐受 RNA 酶消化，半衰期也更长久^[3]。研究表明在宫颈癌细胞中异常表达的 circRNAs 可以调控肿瘤进展^[4]。为探究炎症介质是否调节 circRNAs 表达进而影响宫颈癌细胞恶性行为，用 TNF- α 处理 HeLa 细胞后通过高通量测序发现 circWBCR22 表达水平升高，并深入研究发现其通过吸附微小 RNA (microRNAs, miRNAs)，进而减轻 miRNAs 对靶基因的抑制作用，从而促进宫颈癌细胞迁移和侵袭。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞购自上海 ATCC 细胞库。circWBCR22 和 FAM60A 过表达/敲降载体及其阴性对照载体 pcDNA3.1 (pcDNA) /pshR-NC, miR-512-5p mimic (miR-512-5p) 及阴性对照 miR-NC、miR-512-5p inhibitor (ASO-miR-512-5p) 及阴性对照 ASO-NC 均由上海通用生物有限公司合成。RPMI-1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 GIBCO 公司；TNF- α 、四甲基偶氮唑盐 (tetrazolium salt, MTT)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、结晶紫染液、PVDF 膜、TBST 洗膜液购自上海碧云天生物科技有限公司；lipofectamine 3000、TRIzol、TEMED 购自美国 Invitrogen 公司；RNA 分离试剂盒购自美国 Active motif 公司；SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；Millicell® cell culture insert 购自德国 Billerica MA 公司；Matrigel 胶购自美国 BD Biosciences 公司；GAPDH 抗体、FAM60A 抗体、HRP 标记抗兔二抗购自天津赛尔生物公司；Pierce Renilla Firefy 萤光素酶双重测定试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。细胞培养箱购自美国 Thermo Forma 公司；倒置光学显微镜购自日本 NiKon 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 在含有 8% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中培养，孵育于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中。细胞培养 40 h 后加入 60 ng/mL TNF- α ，作用 8 h 收集细胞，无 TNF- α 处理做为对照组。

1.2.2 细胞转染及分组 将人宫颈癌 HeLa 细胞接种至 6 孔板中, 使用 lipofectamine 3000 试剂将寡核苷酸转染到 HeLa 细胞中, 并分成 Control 组(无 TNF- α 处理)、TNF- α 组(TNF- α 处理)、pcDNA 组(转染 pcDNA)、pshR-NC 组(转染 pshR-NC)、circWBSCR22 组(转染 circWBSCR22)、pshR-circWBSCR22 组(转染 pshR-circWBSCR22)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-512-5p 组(转染 miR-512-5p)、ASO-NC 组(转染 ASO-NC)、ASO-miR-512-5p 组(转染 ASO-miR-512-5p)、FAM60A 组(转染 FAM60A)、pshR-FAM60A 组(转染 pshR-FAM60A)、pcDNA+miR-NC 组(转染 pcDNA+miR-NC)、pcDNA+miR-512-5p 组(转染 pcDNA+miR-512-5p)、circWBSCR22+miR-512-5p 组(转染 circWBSCR22+miR-512-5p)。

1.2.3 逆转录荧光定量 PCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 circWBSCR22、miR-512-5p 和 FAM60A 的 RNA 表达水平 将各组人宫颈癌 HeLa 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞生长密度达到 80%~90%时使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。按照逆转录试剂盒步骤将 RNA 逆转录为 cDNA。通过 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行 RT-qPCR 分析。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 退火 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 共 40 个循环。反应体系: RT 产物 (cDNA) 1.0 μL , 5 pmol/ μL 上/下游引物各 1.0 μL , 2 \times UltraSYBR Mixture 7.5 μL , 加双蒸水补至 15 μL 。利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算各基因 mRNA 相对表达水平, 以 β 激动蛋白 (β -actin) 作为内参照。引物序列参照表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequences
<i>circWBSCR22</i>	F: 5'-CTGCCATGCTGGGTGAGGCTGTG-3' R: 5'-GCAGATAAAGAAGCTCCAATGCTC-3'
<i>miR-512-5p</i>	F: 5'-CACUCAGCCUUGAGGGCACUUUC-3' R: 5'-AAGUGCCCUCAAGGCUGAGUGUU-3'
<i>FAM60A</i>	F: 5'-CTCCAGTTCTCGATTCACTGAC-3' R: 5'-CGAGTCTCATGCAATCCAAAACA-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3' R: 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC-3'
<i>U6</i>	F: 5'-TCACTCCACGGTCGTACTION-3' R: 5'-GCAGATCCTCACCGATTACGG-3'

1.2.4 核质 RNA 分离 根据说明书要求使用 RNA 亚细胞分离试剂盒裂解 HeLa 细胞以分离细胞核和细胞质 RNA。

1.2.5 Western blot 检测 FAM60A 的蛋白表达水平 转染 48 h 后, 1×PBS 洗涤细胞 2 次, 120 μL RIPA 缓冲液在 4 °C 裂解 30 min。通过 SDS-PAGE 将全细胞裂解物分离并转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂乳封闭 2 h 后, 将 PVDF 膜与一抗在 4 °C 下孵育过夜。一抗使用如下: FAM60A (1□200), GAPDH (1□3 000)。用 TBST 溶液洗涤后, 将 PVDF 膜与二抗(绵羊抗兔 IgG-HRP, 1□5 000) 孵育 2 h, 并通过增强化学发光 (ECL) 检测。通过 ImageJ 对谱带强度进行量化。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-512-5p 与 circWBSR22 或 FAM60A 的靶定关系 通过 Circinteractome 数据库预测 miR-512-5p 与 circWBSR22 的潜在结合位点, 通过 Targetscan 数据库预测 miR-512-5p 与 FAM60A 的潜在结合位点。扩增含有 miR-512-5p 结合位点的 circWBSR22 或 FAM60A 3'-UTR 的野生型序列和突变型序列, 分别插入到萤光素酶报告载体 pGL3 中, 构建野生型质粒 (circWBSR22-WT 和 FAM60A 3'-UTR-WT) 和突变型质粒 (circWBSR22-MUT 和 FAM60A 3'-UTR-MUT)。随后将构建的萤光素酶报告基因载体和 miR-NC、miR-512-5p、ASO-NC、ASO-miR-512-5p 共转染到 HeLa 细胞。孵育 24 h 后, 根据 Pierce Renilla Firefy 萤光素酶双重测定试剂盒操作步骤测量萤光素酶活性。

1.2.7 MTT 实验检测细胞活性

转染 24 h 后, 将细胞接种到 96 孔板 (4 000 个细胞/孔) 中, 每个实验组包括 5 个重复孔。在指定的时间点 (24、48、72 h), 加入 MTT (10 μL/孔), 并在 37 °C 下再孵育 4 h。丢弃培养基后, 加入 DMSO (100 μL/孔) 以溶解沉淀的甲酰胺。使用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度 (absorbance, A) (A_{570})。

1.2.8 克隆形成实验检测细胞增殖能力

在转染后 24 h, 将 HeLa (400 个细胞/孔) 细胞接种到 12 孔板中。每四天更换一次新鲜培养基。2 周后, 用 1×PBS 洗涤细胞两次, 用结晶紫染色, 然后计算细胞集落形成率。

1.2.9 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力 通过 Transwell 小室 (8.0 μmol/L 孔径) 检测细胞迁移和侵袭能力, 其中加入 Matrigel 用于侵袭实验, 不加入 Matrigel 用于迁移实验。将冷冻的基质胶与无血清基础培养基 (1□6) 混合, 接种到 Transwell 室 (45 μL/室) 中, 并在 37 °C 下孵育 2 h 以固化。将 HeLa 细胞 (6×10^4 用于迁移, 8×10^4 用于侵袭) 重悬于 200 μL 无血清 RPMI-1640 培养基中, 并接种到上室中。用 600 μL RPMI-1640 或含有 10% FBS 的 DMEM 培养基填充下腔。培养 48 h 或 72 h 后, 用 1×PBS 冲洗下腔, 用棉交换去除下腔上表面未迁移或未侵入的细胞, 并用 750 μL 固定液 (体积比为 1□3 的冰醋酸和甲醇) 固定 20

min。在用 2% 结晶紫染色 5 min 后，在 Nikon TE2000 显微镜下对 5 个随机选择的视场进行成像。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 所有实验数据均使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行，两组间比较采用非配对 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。所有定量数据均显示为平均值 ± 标准差。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验的结果重复至少 3 次。

2 结果

2.1 TNF- α 对 circWBSR22 表达水平的影响 TNF- α 处理宫颈癌 HeLa 细胞后进行 RT-qPCR 实验，与 Control 相比，TNF- α 组 circWBSR22 表达水平升高 ($P < 0.05$)，见图 1A。核质 RNA 分离联合 RT-qPCR 实验结果显示约有 66% 的 circWBSR22 位于细胞质，提示 circWBSR22 主要定位于细胞质中，见图 1B。

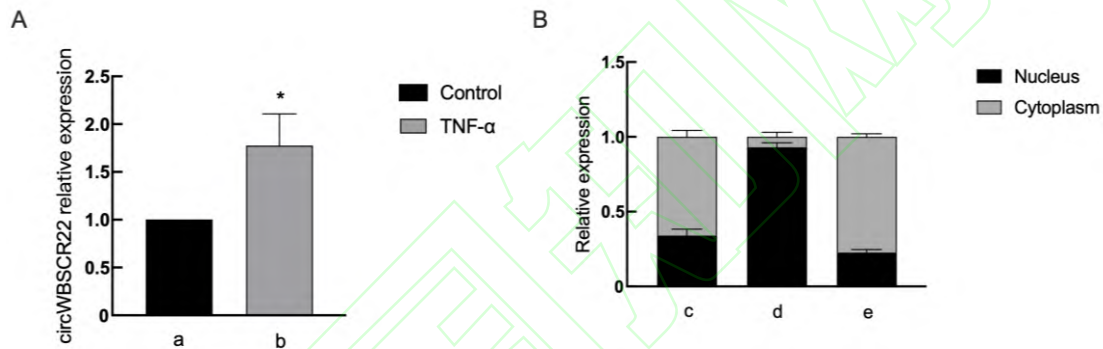


图 1 TNF- α 处理后 HeLa 细胞中 circWBSR22 表达水平及细胞定位

Fig.1 Expression level and cellular localization of circWBSR22 in HeLa cells after TNF- α treatment

A: RT-qPCR was used to detect the expression level of circWBSR22; B: Nuclear-cytoplasmic RNA separation experiment combined with RT-qPCR was used to detect the expression levels of circWBSR22 in the nucleus and cytoplasm. a: Control group; b: TNF- α group; c: circWBSR22 group; d: U6 group; e: β -Actin group; * $P < 0.05$ vs Control group.

2.2 CircWBSR22 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响 RT-qPCR 实验结果显示：相较于各自对照组，过表达组 circWBSR22 表达水平升高 ($P < 0.001$)，敲降组 circWBSR22 表达水平降低 ($P < 0.01$)，表明过表达及敲降质粒构建成功，见图 2A。Transwell 实验结果显示：circWBSR22 组宫颈癌 HeLa 细胞的迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.01$) 数目均高于 pcDNA 组；pshR-circWBSR22 组宫颈癌 HeLa 细胞的迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.01$) 数目较 pshR-NC 组减少，见图 2B、2C。MTT 实验和克隆形成实验结果显示：与各自对照组相

比, circWBSCR22 组和 pshR-circWBSCR22 组宫颈癌 HeLa 细胞的活力和细胞增殖能力变化差异无统计学意义, 见图 2D、2E。结果提示 circWBSCR22 促进宫颈癌 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力, 对细胞活性和细胞增殖能力无影响。

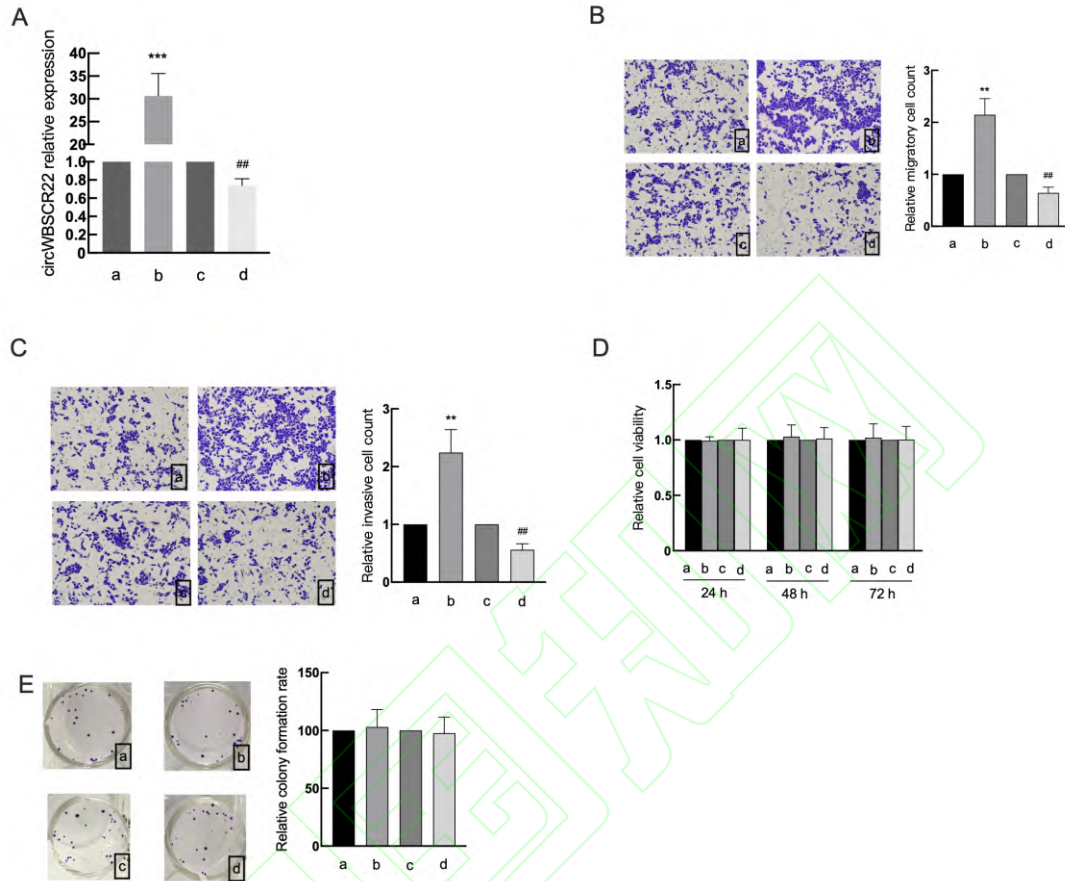


图 2 CircWBSCR22 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移、侵袭、细胞活力和细胞增殖能力的影响
Fig.2 The effects of circWBSCR22 on the migration, invasion, viability, and proliferation of cervical cancer HeLa cells

A: RT-qPCR was used to detect the overexpression of circWBSCR22 and the effectiveness of knockdown plasmids; B: Transwell migration assay was used to detect the relative number of migrated HeLa cells and microscopic images (crystal violet staining $\times 100$) were shown; C: Transwell invasion assay was used to detect the relative number of invaded HeLa cells and microscopic images were shown (crystal violet staining $\times 100$); D: MTT assay was used to detect the effects of circWBSCR22 on cell viability; E: Cell colony formation assay was used to detect the effects of circWBSCR22 on cell proliferation (crystal violet staining); a: pcDNA group; b: circWBSCR22 group; c: pshR-circWBSCR22 group; d: pshR-circWBSCR22 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs pcDNA group; ## $P < 0.01$ vs pshR-NC group.

2.3 CircWBSR22 吸附并调控 miR-512-5p 表达水平

CircInteractome 数据库预测结果显示 circWBSR22 和 miR-512-5p 具有结合位点, 见图 3A。双荧光素酶报告基因实验结果显示: 在 circWBSR22-WT 转染的 HeLa 细胞中, 与 miR-NC 组相比, miR-512-5p 组相对荧光素活性降低 ($P<0.01$); 与 ASO-NC 组比较, ASO-miR-512-5p 组荧光活性升高 ($P<0.05$)。而在 circWBSR22-MUT 转染的 HeLa 细胞中各组之间荧光活性差异无统计学意义, 见图 3A。另外, 在宫颈癌 HeLa 细胞中, 与 pcDNA 组相比, circWBSR22 组 miR-512-5p 表达水平降低 ($P<0.01$); 与 pshR-NC 组相比, pshR-circWBSR22 组 miR-512-5p 表达水平升高 ($P<0.05$), 见图 3B。结果提示 circWBSR22 吸附 miR-512-5p 并降低其表达水平。

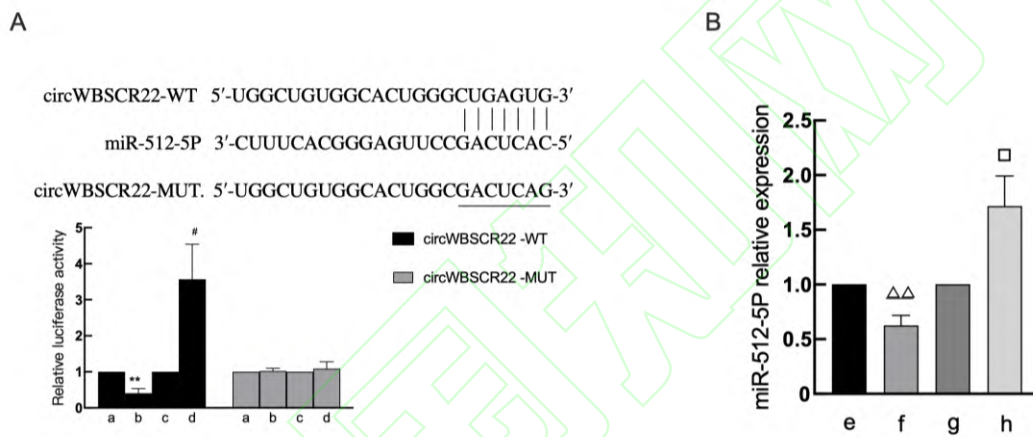


图3 CircWBSR22 吸附并调控 miR-512-5p 表达水平

Fig.3 CircWBSR22 adsorbed and regulated the expression level of miR-512-5p

A: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between circWBSR22 and miR-512-5p; B: RT-qPCR was used to detect the effect of circWBSR22 on the expression level of miR-512-5p; a: miR-NC group; b: miR-512-5p group; c: ASO-NC group; d: ASO-miR-512-5p group; e: pcDNA group; f: circWBSR22 group; g: pshR-circWBSR22 group; h: pshR-circWBSR22 group; ** $P<0.01$ vs miR-NC group; # $P<0.05$ vs ASO-NC group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs pcDNA3 group; $\square P<0.05$ vs pshR-NC group.

2.4 miR-512-5p 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响 细胞功能学实验结果显示: 相比于 miR-NC 组, miR-512-5p 组宫颈癌 HeLa 细胞迁移 ($P<0.01$) 和侵袭 ($P<0.05$) 的细胞数减少; 相比于 ASO-NC 组, ASO-miR-512-5p 组宫颈癌 HeLa 细胞迁移 ($P<0.01$) 和侵袭 ($P<0.01$) 的细胞数增多, 见图 4A、4B。结果提示 miR-512-5p 抑制宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力。

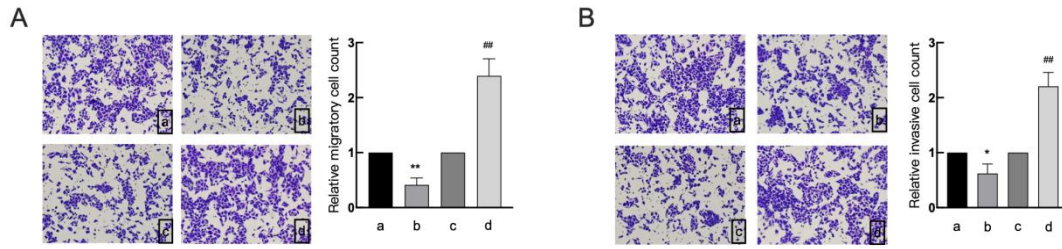


图 4 miR-512-5p 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 The effects of miR-512-5p on the migration and invasion ability of cervical cancer HeLa cells

A: Transwell migration assay was used to detect the relative number of migrated HeLa cells and microscopic images (crystal violet staining $\times 100$) were shown; B: Transwell invasion assay was used to detect the relative number of invaded HeLa cells and microscopic images (crystal violet staining $\times 100$) were shown; a: miR-NC group; b: miR-512-5p group; c: ASO-NC group; d: ASO-miR-512-5p group; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs miR-NC group; ## $P < 0.01$ vs ASO-NC group.

2.5 miR-512-5p 靶向并调控 FAM60A 表达水平

Targetscan 数据库预测结果显示 miR-512-5p 与 FAM60A 存在结合位点, 见图 5A。双荧光素酶报告基因实验结果显示: 在 FAM60A 3'-UTR-WT 转染的 HeLa 细胞中, 与 miR-NC 组相比, miR-512-5p 组荧光活性下降 ($P < 0.01$); 与 ASO-NC 组相比, ASO-miR-512-5p 组荧光活性升高 ($P < 0.01$)。而在 FAM60A 3'-UTR-MUT 转染的 HeLa 细胞中, 各组相对荧光素活性差异无统计学意义, 见图 5A。另外, 在宫颈癌 HeLa 细胞中, 过表达 miR-512-5p 后 FAM60A 的 RNA ($P < 0.05$) 和蛋白 ($P < 0.01$) 表达水平下降, 而封闭 miR-512-5p 后则升高了 FAM60A 的 RNA ($P < 0.01$) 和蛋白 ($P < 0.01$) 表达水平, 见图 5B、5C。结果提示 miR-512-5p 靶向 FAM60A 并抑制其表达。

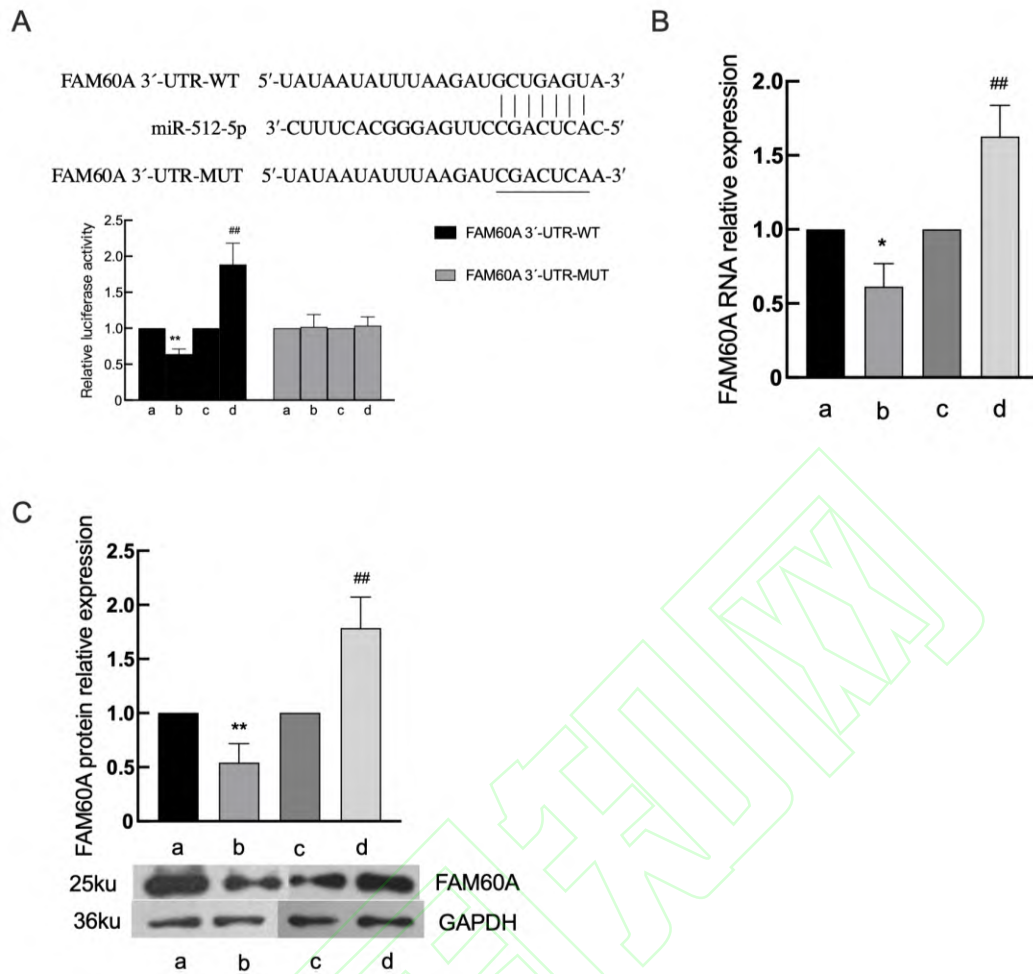


图5 miR-512-5p 靶向并调控 FAM60A 表达水平

Fig.5 miR-512-5p targeted and regulated the expression of FAM60A

A: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-512-5p and FAM60A; B: RT-qPCR was used to detect the effects of miR-512-5p on FAM60A mRNA expression level; C: Western blot experiment was used to detect the effects of miR-512-5p on FAM60A protein expression level; a: miR-NC group; b: miR-512-5p group; c: ASO-NC group; d: ASO-miR-512-5p group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC group; ## $P < 0.01$ vs ASO-NC group.

2.6 FAM60A 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示: 与 pcDNA 组相比, FAM60A 组迁移($P < 0.01$)和侵袭($P < 0.01$)的宫颈癌 HeLa 细胞数目增多; 与 pshR-NC 组相比, pshR-FAM60A 组迁移($P < 0.01$)和侵袭($P < 0.01$)的宫颈癌 HeLa 细胞数目减少, 见图 6A、6B。结果提示 FAM60A 促进宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力。

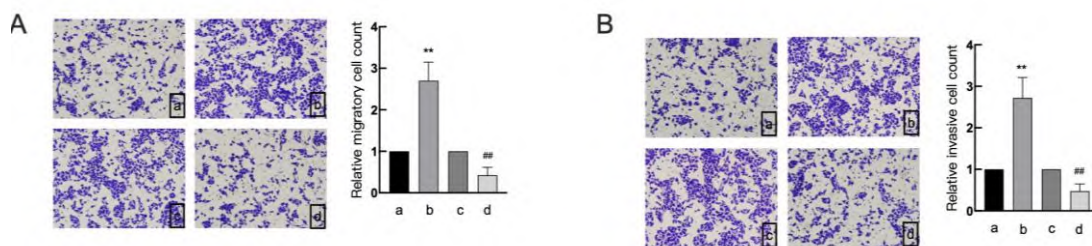


图 6 FAM60A 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.6 The effects of FAM60A on the migration and invasion ability of cervical cancer HeLa cells

A: Relative migration cell count and microscopic image (crystal violet staining $\times 100$) of HeLa cells detected by Transwell migration assay; B: Relative invasion cell count and microscopic image (crystal violet staining $\times 100$) of HeLa cells detected by Transwell invasion assay; a: pcDNA group; b: FAM60A group; c: pshR-NC group; d: pshR-FAM60A group; ** $P < 0.01$ vs pcDNA group; ## $P < 0.01$ vs pshR-NC group.

2.7 CircWBSCR22 通过 miR-512-5p/FAM60A 轴对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响

RT-qPCR 实验和 Western blot 实验结果显示：相比于 pcDNA 组，过表达 circWBSCR22 后 FAM60A 的 RNA ($P < 0.01$) 和蛋白 ($P < 0.05$) 表达水平升高；相比于 pshR-NC 组，敲降 circWBSCR22 后 FAM60A 的 RNA ($P < 0.05$) 和蛋白 ($P < 0.01$) 表达水平降低，见图 7A、7B。分子生物学挽救实验显示：相比于 pcDNA+miR-NC 组，pcDNA+miR-512-5p 组 FAM60A 的 RNA ($P < 0.01$) 和蛋白 ($P < 0.001$) 表达水平降低；相比于 pcDNA+miR-512-5p 组，circWBSCR22+miR-512-5p 组 FAM60A 的 RNA ($P < 0.01$) 和蛋白 ($P < 0.001$) 表达水平升高，见图 7C、7D。同样，细胞功能学挽救实验显示：相比于 pcDNA+miR-NC 组，pcDNA+miR-512-5p 组迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.05$) 的细胞数目减少；相比于 pcDNA+miR-512-5p 组，circWBSCR22+miR-512-5p 组迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.05$) 的细胞数目增多，见图 7E、7F。

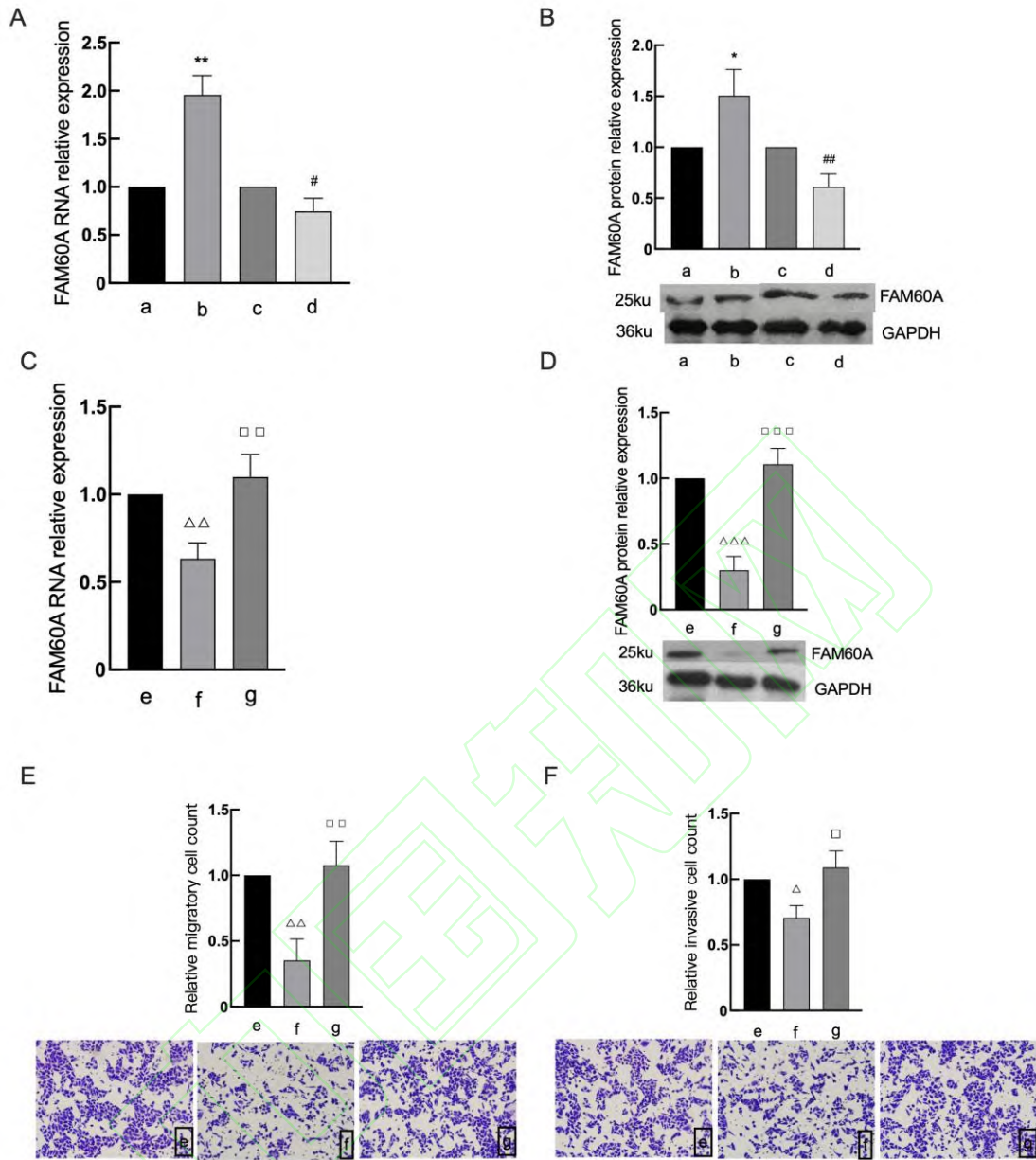


图7 CircWBSR22通过miR-512-5p/FAM60A轴对宫颈癌Hela细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.7 The effects of circWBSR22 on the migration and invasion ability of cervical cancer HeLa cells via mir-512-5p/FAM60A axis

A: RT-qPCR was used to detect the effect of circWBSR22 on the expression level of FAM60A RNA; B: Western blot was used to detect the effect of circWBSR22 on the expression level of FAM60A protein; C-D: RNA and protein levels of FAM60A in the pcDNA+miR-NC group, pcDNA+miR-512-5p group, and circWBSR22+miR-512-5p group; E-F: Relative migration and invasion cell number of HeLa cells in the pcDNA+miR-NC group, pcDNA+miR-512-5p group,

and circWBSCR22+miR-512-5p group, along with microscopic images (crystal violet staining $\times 100$); a: pcDNA group; b: circWBSCR22 group; c: pshR-NC group; d: pshR-circWBSCR22 group; e: pcDNA+miR-NC group; f: pcDNA+miR-512-5p group; g: circWBSCR22+miR-512-5p group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pcDNA group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs pshR-NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs pcDNA+miR-NC group; $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$, $\square\square\square P < 0.001$ vs pcDNA+miR-512-5p group.

3 讨论

已有研究^[5-6]表明炎症因子在诱导癌症发生过程中会导致大量非编码 RNA (noncoding RNAs, ncRNAs) 的异常表达, 并对细胞内致癌或抑癌基因的表达起到调节作用。作为炎症微环境的关键介质, TNF- α 在炎症相关性癌症中发挥重要功能。为探究 TNF- α 在肿瘤细胞中的作用是否有 circRNAs 参与, 首先用 60 ng/mL TNF- α 处理 HeLa 细胞, 通过高通量测序检测并分析异常表达的 circRNAs, 结果显示 circWBSCR22 水平升高较为明显。随后通过 RT-qPCR 验证 TNF- α 确实可以促进 circWBSCR22 表达。关于 TNF- α 对肿瘤进展的影响方面, 有研究^[7]表明 60 ng/mL TNF- α 上调 CircDMD 的表达促进肿瘤增殖、转移和自噬。另有研究^[8]表明 100 ng/mL 高剂量的 TNF- α 增加 miR-765 的表达并可以在体外显著抑制口腔鳞状细胞癌细胞的迁移。这表明 TNF- α 等炎性因子在肿瘤中的作用具有剂量和空间异质性。TNF- α 使用剂量/作用时间及作用部位不同, 使其调控不同的特定基因从而发挥不同生物学作用。

CircRNAs 与癌症的发生发展密切相关, 已有大量研究表明多种 circRNAs 发挥抑癌或促癌作用^[9]。同样, 在宫颈癌中异常表达的 circRNAs 也可以影响肿瘤进展, 如宫颈癌细胞中显著上调的 circRNA_PLEKHM3 可以调控宫颈癌细胞的上皮间质转化^[10]。为探究 circWBSCR22 是否影响宫颈癌进展, 进行了一系列细胞功能学实验。实验结果表明过表达 circWBSCR22 促进宫颈癌 HeLa 细胞的迁移和侵袭, 但对细胞活性和细胞增殖能力无明显影响。因此后续仅进行迁移和侵袭实验。CircRNAs 可作为 miRNAs “海绵”调控下游靶基因的表达影响癌症的发生发展^[3]。核质 RNA 分离实验表明 circWBSCR22 主要存在于细胞质中, 这一特性增加了其吸附 miRNAs 的可能性, 因此 circWBSCR22 可能通过调控 miRNAs 表达发挥生物学功能。为进一步探究 circWBSCR22 是否存在类似作用机制, 首先通过 CircInteractome 数据库预测发现 circWBSCR22 与 miR-512-5p 存在相互作用位点, 而后通过双荧光素酶报告基因实验证实了二者之间的靶定关系。过表达 circWBSCR22 明显抑制了宫颈癌细胞中 miR-512-5p 水平, 细胞功能挽救实验结果显示, circWBSCR22 挽救了 miR-512-5p

的抑癌作用。这表明 miR-512-5p 参与了 circWBSCR22 对宫颈癌细胞恶性进展的负调控作用。此外, circRNAs 还可以与 DNA 或蛋白质相互作用^[3]。研究^[11]表明, circWBSCR22 直接与 UPF1 结合, 阻碍了 CHD4 蛋白泛素化降解从而促进结直肠癌转移。这说明 circWBSCR22 可以通过与不同分子相互作用影响肿瘤进展。

miRNAs 主要通过靶向和调控 mRNAs 参与细胞增殖、分化和细胞周期的调控等肿瘤生物学行为^[12]。本研究表明 miR-512-5p 抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。为探究 miR-512-5p 通过调控哪种靶 mRNA 发挥作用, 通过利用 Targetscan 数据库预测发现 miR-512-5p 与 FAM60A 存在潜在结合位点, 双荧光素酶报告基因实验证实了二者之间的靶定关系, 且后期实验证实 miR-512-5p 靶向并抑制 FAM60A 表达。FAM60A 是 Sin3 脱乙酰酶复合物的一个新亚基, 在细胞周期调控、细胞形态改变、细胞增殖、分化迁移等方面发挥重要作用^[13]。已有研究^[14]表明 FAM60A 影响肿瘤细胞迁移和侵袭, 因而选择 FAM60A 作为候选目标靶基因进行研究。实验结果证实 FAM60A 促进宫颈癌 HeLa 细胞的迁移和侵袭。为确定 circWBSCR22 对宫颈癌 HeLa 细胞迁移侵袭能力影响是通过 miR-512-5p/FAM60A 轴发挥作用的, 进行了挽救实验。实验结果进一步证实 circWBSCR22 通过 miR-512-5p 促进 FAM60A 表达。由此可见, TNF- α 调控的 circWBSCR22 通过 miR-512-5p/FAM60A 轴促进宫颈癌细胞迁移和侵袭。

本研究揭示 TNF- α 可以通过 circWBSCR22/miR-512-5p/FAM60A 轴促进宫颈癌细胞迁移和侵袭, 为炎症驱动的肿瘤进展提供了分子途径。靶向 circWBSCR22 可能成为宫颈癌精准治疗的候选分子。但该研究主要基于细胞内实验, 尚需通过动物模型进一步验证 circWBSCR22 对肿瘤生长和转移的影响。且 circWBSCR22 可能通过与其他 miRNAs 或蛋白质发生相互作用, 接下来将通过多组学联合分析其互作网络, 更深入全面的阐明其作用机制。

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63. doi:10.3322/caac.21834.
- [2] Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(3): 409-16. doi:10.1007/s10555-006-9005-3.
- [3] Chen L, Shan G. CircRNA in cancer: fundamental mechanism and clinical potential[J]. Cancer Lett, 2021, 505: 49-57. doi:10.1016/j.canlet.2021.02.004.
- [4] Begliarzade S, Sufianov A, Ilyasova T, et al. Circular RNA in cervical cancer: fundamental mechanism and clinical potential[J]. Non Coding RNA Res, 2024, 9(1): 116-24.

doi:10.1016/j.ncrna.2023.11.009.

[5] Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, et al. Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5421. doi:10.3390/ijms22115421.

[6] Elinav E, Nowarski R, Thaiss C A, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11): 759-71. doi:10.1038/nrc3611.

[7] Sun Q, Yang Z, Qiu M, et al. Inflammatory factor TNF α -induced circDMD mediates R-loop formation to promote tumorigenesis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 280: 135689. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.135689.

[8] Zheng Z, Luan X, Zha J, et al. TNF- α inhibits the migration of oral squamous cancer cells mediated by miR-765-EMP3-p66Shc axis[J]. *Cell Signal*, 2017, 34: 102-9. doi:10.1016/j.cellsig.2017.03.009.

[9] Conn V M, Chinnaiyan A M, Conn S J. Circular RNA in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(9): 597-613. doi:10.1038/s41568-024-00721-7.

[10] 张亚男, 崔莹, 王天娇, 等. 环状 RNA_PLEKHM3 通过 miR-320/KLF4 轴调控宫颈癌细胞上皮间质转化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(3): 403-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.006.

[10] Zhang Y N, Cui Y, Wang T J, et al. CircRNA_PLEKHM3 regulates epithelial mesenchymal transformation of cervical cancer cells through the miR-320/KLF4 axis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(3): 403-12. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.006.

[11] Luo J, Xu S, Wang J, et al. Circular RNA circWBSR22 facilitates colorectal cancer metastasis by enhancing CHD4' s protein stability[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282: 137135. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.137135.

[12] Bartel David P. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97.

[13] 孙永红, 孙晓伟, 杨琳, 等. FAM60A 在细胞功能调控作用中的研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2021, 43(3): 469-74.

[13] Sun Y H, Sun X W, Yang L, et al. Research progress of FAM60A in the regulation of cellular function[J]. *Acta Acad Med Sin*, 2021, 43(3): 469-74.

[14] Dong Z, Jin S, Tang K, et al. FAM60A promotes proliferation and invasion of colorectal

cancer cells by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Transl Cancer Res*, 2025, 14(2): 1171-89. doi:10.21037/tcr-24-1608.

