

网络出版时间:2026-03-12 17:42:21 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260506.1114.009

TNF- α 调控的 circWBSR22 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(circWBSR22)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 circWBSR22 表达水平。核质RNA分离实验检测 circWBSR22 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 circWBSR22 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 circWBSR22 表达水平升高($P < 0.05$)。大约66%的 circWBSR22 存在于细胞质中。相比于对照组,转染 circWBSR22 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 circWBSR22-WT 和 miR-NC 组相比,共转染 circWBSR22-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 circWBSR22 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($P < 0.01$)能力增强。与对照组相比,转染 circWBSR22 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, circWBSR22+ 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 circWBSR22/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 ; circWBSR22; miR-512-5p; FAM60A; 迁移; 侵袭

中图分类号 R737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0689-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.013

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]。高危型人乳头瘤病毒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性因子。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^[4]表明在宫颈癌细胞中异常表达的 circRNAs 可以调控肿瘤进展。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 circWBSR22 表达水平升高,并深入研究发现其通过吸附微小RNA(microRNAs, miR-

2026-02-20 接收

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科研项目(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

NAs),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。circWBSCR22 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)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、结晶紫染液、PVDF 膜、TBST 洗膜液购自上海碧云天生物技术有限公司; 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 μ g/mL 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中培养, 孵育于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 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 $^{\circ}$ C, 10 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 15 s; 退火 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。反应体系: RT 产物 (cDNA) 1.0 μ L, 5 pmol/ μ L 上/下游引物各 1.0 μ L, 2 \times UltraSYBR Mixture 7.5 μ L, 加双蒸水补足至 15 μ L。利用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 公式计算各基因 mRNA 相对表达水平, 以 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
circWBSCR22	F: 5'-CTGCCATGCTGGGTGAGGCTGTG-3'
	R: 5'-GCAGATAAAGAAGCTCCAATGCTC-3'
miR-512-5p	F: 5'-CACUCAGCCUUGAGGGCACUUUC-3'
	R: 5'-AAGUGCCCUCAAGGCUGAGUGUU-3'
FAM60A	F: 5'-CTCCAGTTCGATTCACTGAC-3'
	R: 5'-CGACTCTCATGCAATCCAAAACA-3'
β -actin	F: 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTG-3'
	R: 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3'
U6	F: 5'-TCACTCCACGGTCTGTA-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 \times PBS 洗涤细胞 2 次, 120 μ L RIPA 缓冲液在 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 circWBSCR22 或 FAM60A 的靶定关系 通过

CircInteractome 数据库预测 miR-512-5p 与 circWB-SCR22 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 circWBSCR22 或 FAM60A 3'-UTR 的野生型和突变型序列,分别插入到萤光素酶报告载体 pGL3 中,构建野生型质粒 (circWBSCR22-WT 和 FAM60A 3'-UTR-WT) 和突变型质粒 (circWBSCR22-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 Firefly 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/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 μ L/孔),并在 37 $^{\circ}$ C 下再孵育 4 h。丢弃培养基后,加入 DMSO (100 μ L/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/孔) 细胞接种到 12 孔板中。每 4 d 更换 1 次新鲜培养基。2 周后,用 1 \times PBS 洗涤细胞 2 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 μ mol/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 μ L/室) 中,并在 37 $^{\circ}$ 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 μ L 无血清 RPMI-1640 培养基中,并接种到上室中。用 600 μ L 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 \times 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 μ L 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 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)。 $P<0.05$ 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 circWBSCR22 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 circWBSCR22 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 circWBSCR22 位于细胞质,提示 circWBSCR22 主要定位于细胞质中,见图 1B。

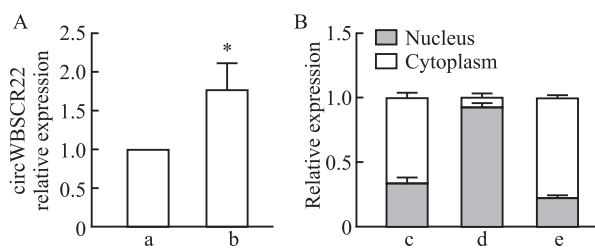


图 1 TNF- α 处理后 HeLa 细胞中 circWBSCR22 表达水平及细胞定位

Fig. 1 Expression level and cellular localization of circWBSCR22 in HeLa cells after TNF- α treatment

A: RT-qPCR was used to detect the expression level of circWBSCR22; B: Nuclear-cytoplasmic RNA separation experiment combined with RT-qPCR was used to detect the expression levels of circWBSCR22 in the nucleus and cytoplasm; a: Control group; b: TNF- α group; c: circWBSCR22 group; d: U6 group; e: β -Actin group; * $P<0.05$ vs Control group.

2.2 CircWBSCR22 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 circWBSCR22 表达水平升高 ($P<0.001$),敲降组 circWBSCR22 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: circWBSCR22 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-circWBSCR22 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。

2.3 CircWBSCR22 吸附并调控 miR-512-5p 表达水平 CircInteractome 数据库预测结果显示 circWB-

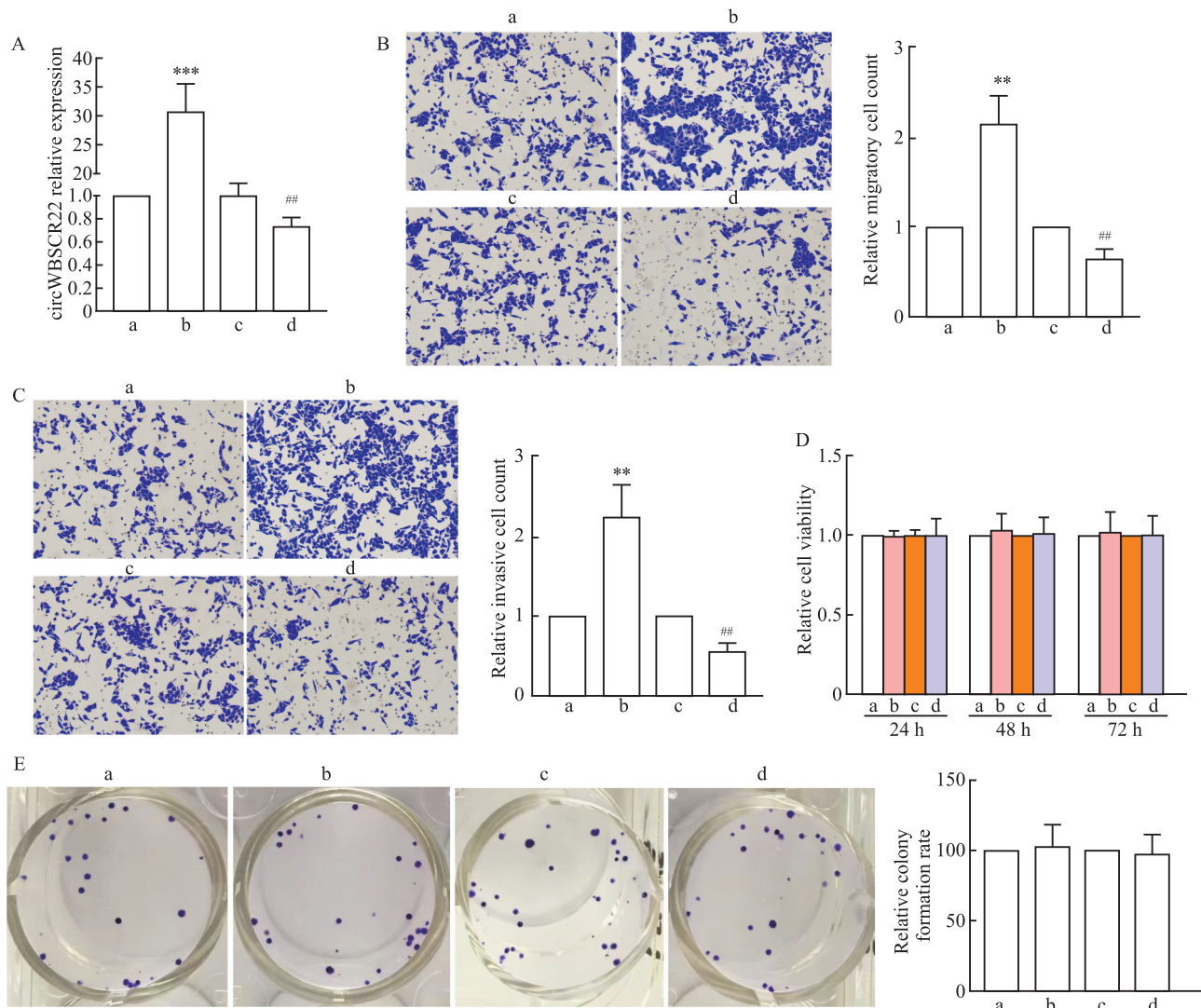


图2 CircWBSR22对宫颈癌HeLa细胞迁移、侵袭、细胞活力和细胞增殖能力的影响

Fig. 2 The effects of circWBSR22 on the migration, invasion, viability, and proliferation of cervical cancer HeLa cells

A: RT-qPCR was used to detect the overexpression of circWBSR22 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 circWBSR22 on cell viability; E: Cell colony formation assay was used to detect the effects of circWBSR22 on cell proliferation (crystal violet staining); a: pcDNA group; b: circWBSR22 group; c: pshR-NC group; d: pshR-circWBSR22 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs pcDNA group; ## $P < 0.01$ vs pshR-NC group.

SCR22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。

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。

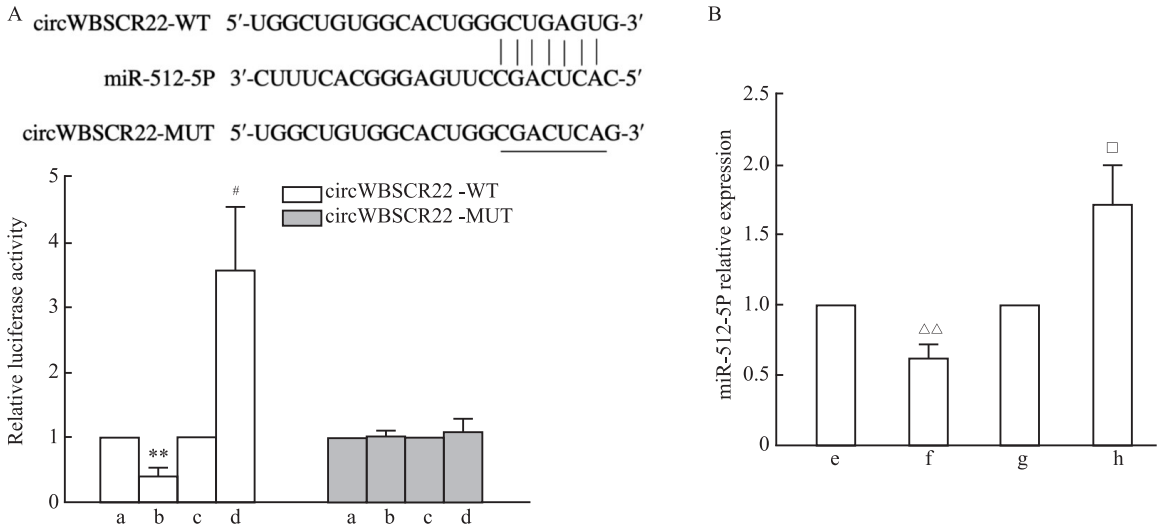


图3 CircWBSR22吸附并调控miR-512-5p表达水平

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-NC 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 pcDNA group; $\square P < 0.05$ vs pshR-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 靶定 FAM60A 并抑制其表达。

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 6。结果提示 FAM60A 促进宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力。

2.7 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 RT-qPCR 实验和 Western blot 实验结果显示: 相比于 pcDNA 组, 过表达 circWBSR22 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 circWBSR22 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, circWBSR22+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, circWBSR22+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。

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 circWBSR22 水平升高较为明显。随后通过

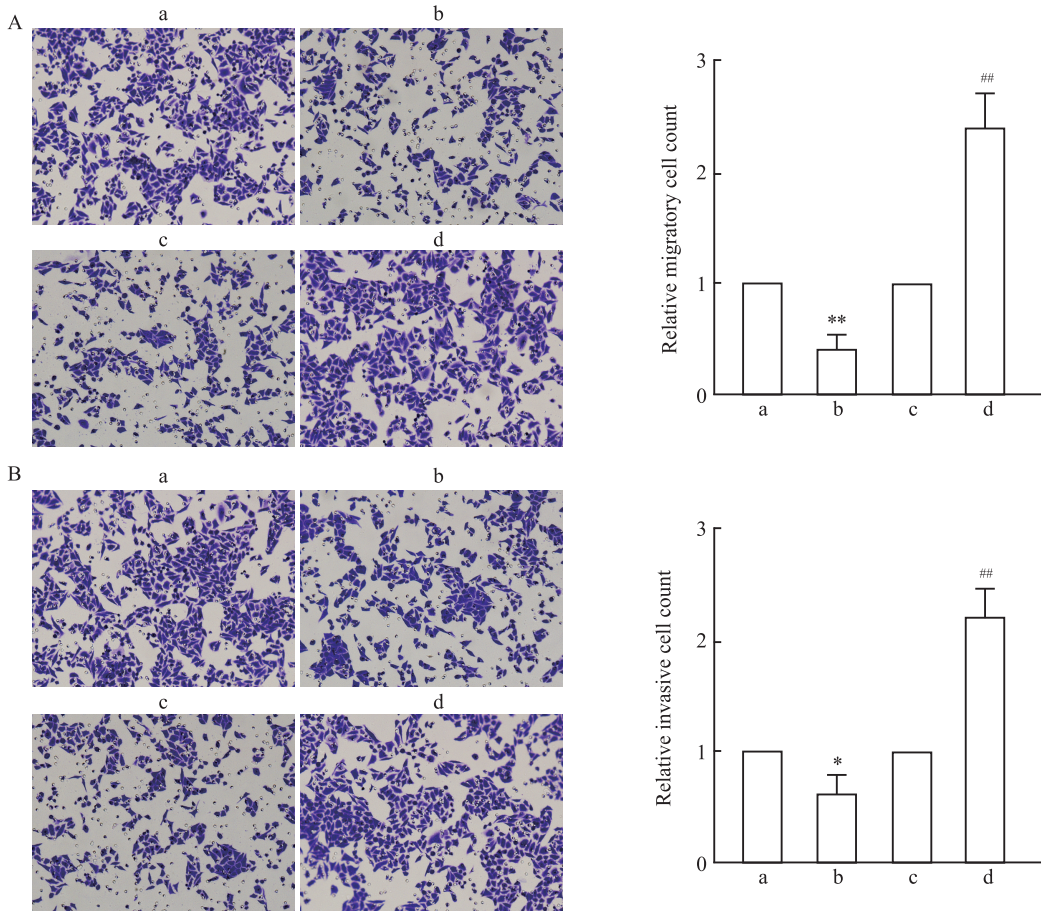


图4 miR-512-5p对宫颈癌HeLa细胞迁移和侵袭能力的影响

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; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC group; ## $P < 0.01$ vs ASO-NC group.

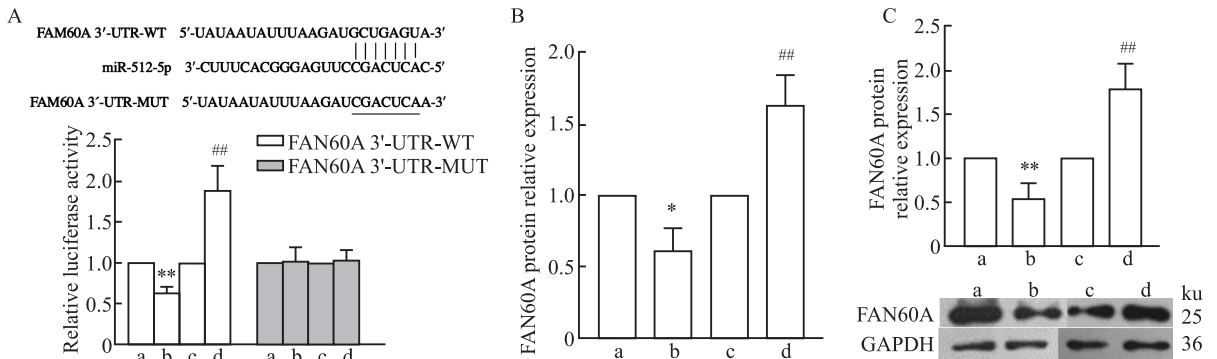


图5 miR-512-5p靶向并调控FAM60A表达水平

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.

RT-qPCR 验证 TNF- α 确实可以促进 circWBSR22 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

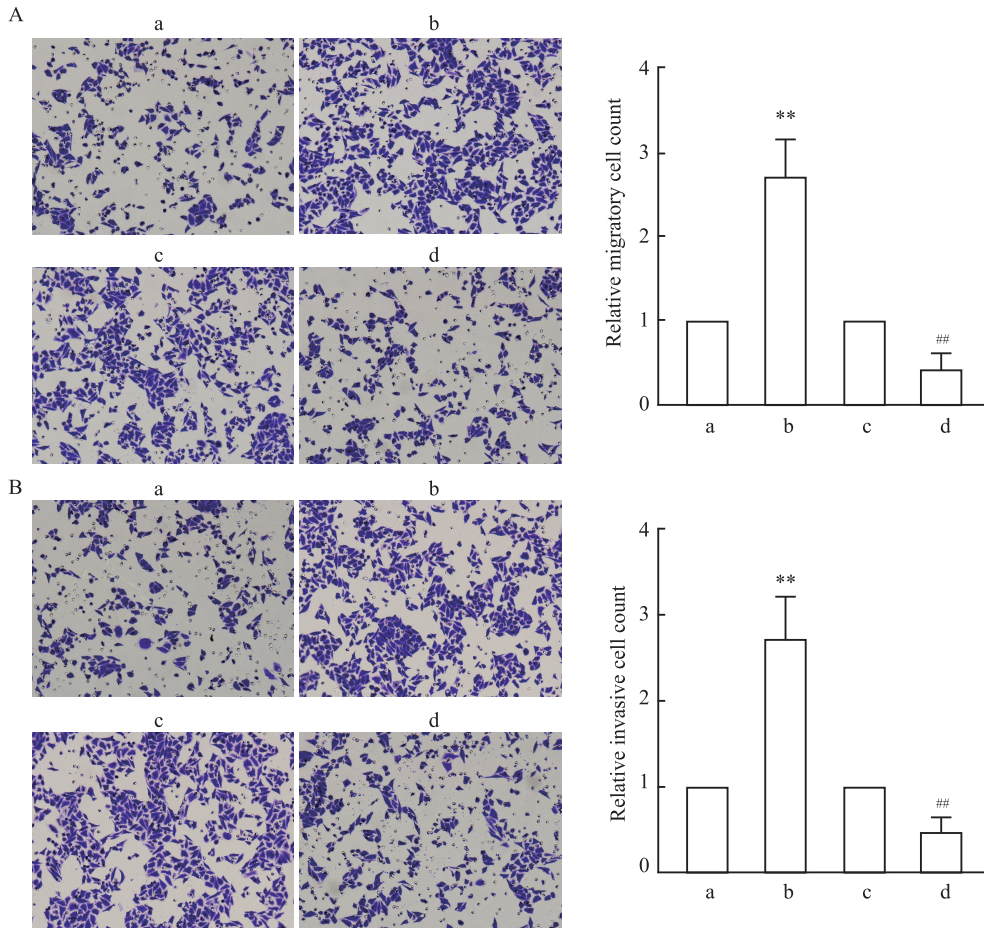


图6 FAM60A对宫颈癌HeLa细胞迁移和侵袭能力的影响

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.

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

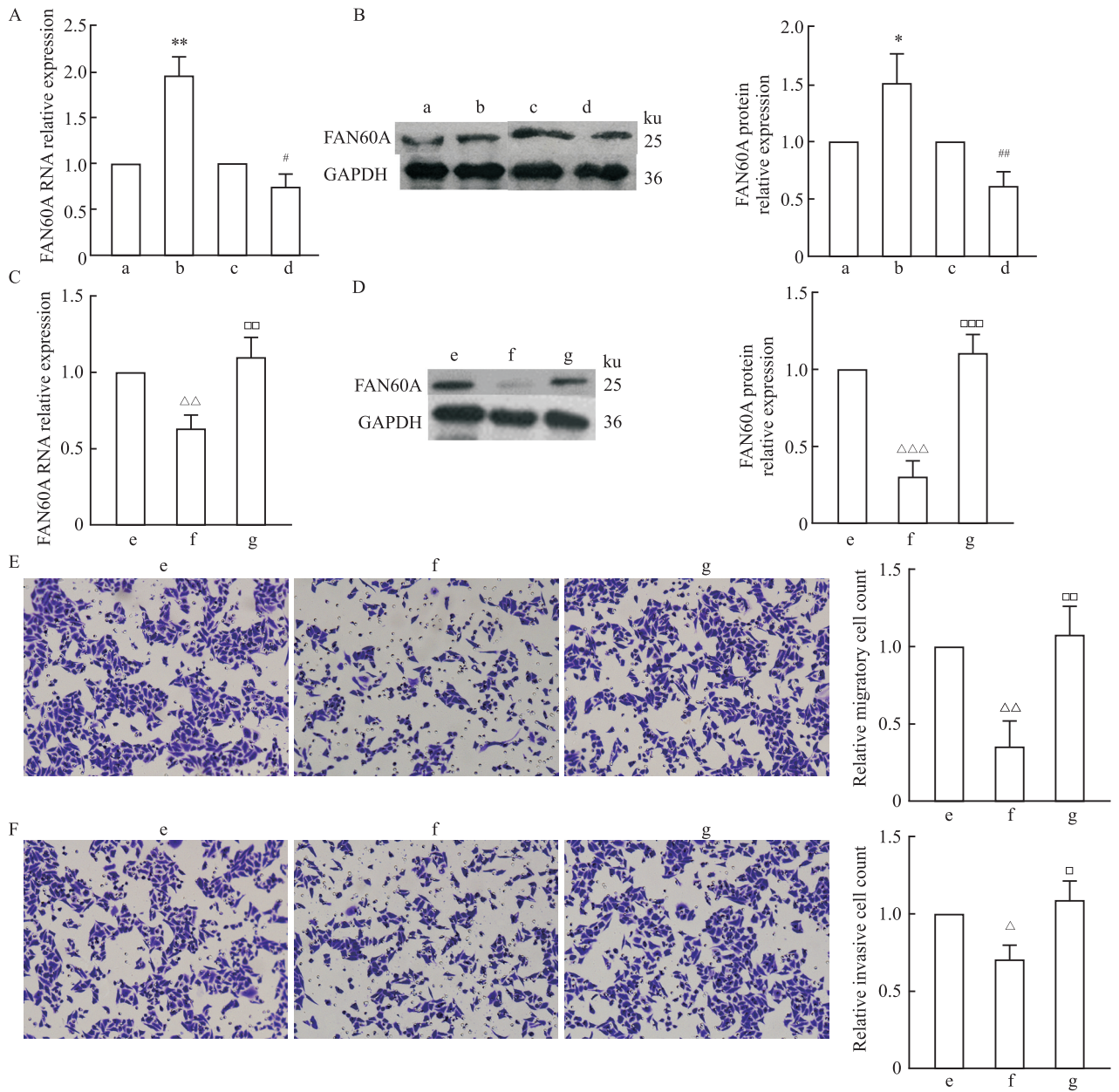


图7 CircWBSR22通过 miR-512-5p/FAM60A 轴对宫颈癌 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的影响

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 circWBSR22+miR-512-5p group, along with microscopic images (crystal violet staining $\times 100$); a: pcDNA group; b: circWBSR22 group; c: pshR-NC group; d: pshR-circWBSR22 group; e: pcDNA+miR-NC group; f: pcDNA+miR-512-5p group; g: circWBSR22+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.

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 circWBSCR22 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/ter-24-1608.

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}

⁽¹⁾ Dept of Blood Transfusion, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, Tianjin 300202;

⁽²⁾ National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300202; ⁽³⁾ Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300202; ⁽⁴⁾ Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300202;

⁽⁵⁾ Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300202)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-regulated cir-

cular 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); Scientific Research Project of Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital (No. Y1905)

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