DOI:10.16016/j.2097-0927.202204222

# RNA 测序揭示肾母细胞瘤中潜在的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络

向 彬,田小毛,米 滔,金黎明,陈美玲,刘 丰,刘 星,林 涛,魏光辉 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,儿童泌尿生殖发育与组织工程重点实验室,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 基于高通量 RNA 测序技术和生物信息学分析鉴定肾母细胞瘤(wilms tumor,WT)中潜在的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络。**方法** 收集 2021 年 6 月至 2022 年 3 月期间重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科的 WT 患者的肿瘤切除组织共 25 例。RNA 测序技术分析 4 对配对的肿瘤和癌旁正常组织的 circRNA(DEcircRNA)和 mRNA(DEmRNA)差异表达谱。对差异分子进行基于 miRanda 的 miRNA 靶点预测,基于相同位点和协同表达建立完整的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络。最后验证关键环状 RNA 的功能。**结果** 筛选出 314 个 DEcircRNAs 和 1 612 个 DEmRNAs。通过 RT-qPCR 在组织中随机选择 12 个 circRNA 进行表达量验证,其中 7 个 circRNA 显示出与测序结果一致的趋势。基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)分析提示 DEcircRNA 的亲本基因和 DEmRNA 主要富集到细胞增殖、癌症和多种代谢相关通路中。利用 miRanda 预测工具识别 DEcircRNA 和 DEmRNA 的共同 miRNA 靶点,以此构建完整的 circRNA-miRNA-mRNA 网络。基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)提示 ceRNA 网络中的靶基因与细胞周期和免疫应答有关。为了鉴定关键的下游靶点,基于 STRING 数据库建立了 127 个 ceRNA 网络中靶基因的 PPI(protein-protein interaction)网络,并进一步确定了前 10 个 HUB 基因。其中,4 个 HUB 基因(*TP*53、*KANK*3、*LLGL*1 和 *TOPA*3)被证实与 WT 的预后密切相关。基于具有预后意义的关键靶基因构建 circRNA 作用的调控子网络。最后,通过 CCK-8、划痕、Transwell 和流式细胞实验,发现沉默子网络中的 circRNA(hsa_circ_0009035)抑制了 WT 细胞的增殖、迁移、侵袭和细胞周期分布($P<0.05$)。**结论** 本研究展示了 WT 中 circRNAs 的全面表达,构建了潜在的 circRNA 相关的 ceRNA 调控网络,深入阐释了 WT 发生发展的调控机制。

[关键词] Wilms 瘤;肾母细胞瘤;RNA 测序;环状 RNA;ceRNA 网络
[中图法分类号] R318.04; R394.3; R737.11 [文献标志码] A

# RNA sequencing reveals a regulatory network of circRNA-miRNA-mRNA ceRNA in Wilms tumor

XIANG Bin, TIAN Xiaomao, MI Tao, JIN Liming, CHEN Meiling, LIU Feng, LIU Xing, LIN Tao, WEI Guanghui

Department of Urology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] Objective To identify the potential circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks in

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(cstc2021jcyj-msxmX0345);重庆医科大学附属儿童医院临床医学研究一般项目(NCRC-2019-GP-08);重庆市科卫联合医学科研项目(2022GDRC009)

[通信作者] 刘 丰,E-mail:liufeng@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Wilms tumor (WT) based on high-throughput RNA sequencing technology and bioinformatics analysis. **Methods** A total of 25 WT specimens were collected from the patients undergoing surgical treatment in our department during June 2021 and March 2022. The differential expression profiles of circRNA (DEcircRNA) and mRNA (DEmRNA) of 4 paired tumor and adjacent normal tissues were analyzed by RNA sequencing. Then, these differential molecules were subjected to miRanda-based miRNA target prediction to establish a complete circRNA-miRNA-mRNA regulatory network based on identical loci and co-expression. Finally, the function of the key circRNAs was validated. **Results** We screened 314 DEcircRNAs and 1 612 DEmRNAs out. Of these, 12 circRNAs were randomly selected by RT-qPCR in the tumor tissues to make expression verification, and 7 of them showed a trend consistent with the sequencing results. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analyses suggested that the parental genes of DEcircRNAs and DEmRNAs were mainly enriched in cell proliferation, cancer, and various metabolism-related pathways. The miRanda prediction tool identified common miRNA targets of DEcircRNAs and DEmRNAs as a means to construct a complete circRNA-miRNA-mRNA network. Gene set enrichment analysis (GSEA) suggested that the target genes in the ceRNA network were associated with cell cycle and immune response. To identify key downstream targets, a protein-protein interaction (PPI) network of 127 target genes in the ceRNA network was established based on the STRING database, and 10 hub genes were further identified. Among them, 4 hub genes (TP53, KANK3, LLGL1 and TOPA3) were confirmed to be closely associated with the prognosis of WT. Subsequently, a regulatory sub-network of circRNA action was constructed based on the key target genes with prognostic significance. Finally, silencing of circRNA (hsa_circ_0009035) in the sub-network was found to significantly inhibit the proliferation, migration, invasion and cell cycle distribution of WT cells by CCK-8 assay, cell scratch assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** The comprehensive expression of circRNAs in WT is revealed and a potential circRNA-associated ceRNA network is constructed, which profoundly clarify the regulatory mechanism of the occurrence and development of WT.

[**Key words**] Wilms tumor; nephroblastoma; RNA sequencing; circRNA; ceRNA network

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0345), the General Project of Clinical Medical Research of Children's Hospital of Chongqing Medical University (NCRC-2019-GP-08) and the Joint Medical Scientific Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2022GDRC009). Corresponding author: LIU Feng, E-mail: liufeng@hospital.cqmu.edu.cn

肾母细胞瘤(wilms tumor,WT)是最常见的儿童肾脏恶性肿瘤,在所有儿童恶性肿瘤中约占6%;15岁以下儿童中,发病率约为7.1/100 000[1]。随着化疗、手术、放疗等多种治疗手段的综合应用,总体生存率已经超过90%[2]。然而,间变病理类型和复发患者的预后仍然很差[3-5]。进一步探索WT发生发展的分子机制对WT患者接受更好的治疗、获得更好的整体预后具有重要意义。环状RNA(circRNA)是一类新型的非编码RNA,其主要定位于细胞质中,提示它们在转录后水平发挥调控作用[6]。然而,circRNA表达谱及其在肾母细胞瘤发生发展中的作用机制仍不清楚。既往的研究表明circRNAs调控肿瘤进展的主要途径是作为一种竞争性内源性RNA(ceRNA),通过miRNA的海绵作用进一步调节下游mRNA的表达[7-8]。因此,为了探索circRNA相关的ceRNA调控网络在肾母细胞瘤发生发展过程中的潜在机制,本研究对临床来源的肿瘤样本进行测序分析,鉴定差异表达的circRNAs和mRNAs;并基于自己的测序数据构建WT中一个潜在的circRNA-miRNA-mRNA调控网络。

## 1 材料与方法

### 1.1 肿瘤组织样本

本研究方案获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准(批件号:2022年伦审第50号)。收集2021年6月至2022年3月期间重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科的WT患者的肿瘤切除组织。根据美国儿童肿瘤协作组(Children's Oncology Group,COG)标准[9](没有前期化疗),所有样本诊断为肾母细胞

瘤。如果病理结果报告神经母细胞瘤、横纹肌样瘤或透明细胞肉瘤等,则被排除。共纳入 25 例配对的肿瘤及邻近正常组织标本。选择 8 对新鲜的肿瘤和配对正常组织进行 mRNA 测序,获得肾母细胞瘤中 mRNA 的表达数据;选择 4 对配对的肿瘤组织进行 circRNA 测序,以获得完整的 circRNA 表达数据。剩余 13 对配对的肿瘤标本被冷冻储存在液氮中,用于 RT-qPCR 验证。

### 1.2 circRNA 测序和 mRNA 测序

按照提示,用 RiboZero rRNA 去除试剂盒(Epicentre,WI,USA)处理 4 对 WT 样品的总 RNA。将 rRNA 耗尽和 RNase R 酶切后的 RNA 样品进行片段化,用随机引物合成 cDNA。纯化 cDNA 的 PCR 扩增产物,用 NovaSeq6000(Illumina,San Diego,CA,USA)对 RNA 文库进行质量控制和测序。使用 fastp[10]软件对序列进行过滤,获得可用于数据分析的“clean reads”。在得到测序读数以后,采用 CIRI 软件[11]对 circRNA 进行预测。在以上预测的基础上,根据 circRNA 在染色体上的位置信息,合并全部样本中的 circRNA 结果对合并后结果进行重新编码 ID。而后将其与 circBase 数据库[12]进行比对,从而识别出已注释的和新预测的 circRNA。

本次 mRNA 测序为 16 个样本的双端测序。使用 RNeasy mini 试剂盒(Qiagen, Germany)提取总 RNA。使用 TruSeq™ RNA 样品制备试剂盒(Illumina,USA)按照指南合成双端文库。纯化的文库用 Qubit® 2.0 荧光仪(Life Technologies,USA)进行定量,并由 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, USA)进行验证,以确认插入物的大小并计算出分子浓度。在 Illumina NovaSeq 6000 上进行测序。使用 FastQC 软件对测序得到的结果进行质量评估。使用 FASTX-Toolkit 软件(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)对原始序列进行清洗过滤得到“clean reads”。使用 Hisat2 软件[13]将得到的“clean reads”比对到已知的参考基因组(GRCh38.91)上。

### 1.3 circRNA 和 mRNA 的差异表达分析

为了量化 mRNA 的表达丰度,使用 FPKM(Fragments PerKilobase Million)来表征不同基因的表达量,其计算公式如下:

$$FPKM=\frac{total\ exon\ Fragments}{mapped\ raeds\ (Millions)\times exon\ length(KB)}$$

首先使用 Stringtie 软件[14]对比对后每个基因区段内的片段进行计数,然后再使用 TMM(trimmed mean of M values)算法进行归一化,最后再计算每个基因的 FPKM 值。在得到基因的 FPKM 表达值以后,使用 edgeR 软件包[15]对组间基因表达进行差异分析(配对 $t$ 检验),得出组间基因表达的 $P$ 值以及经过多重比较检验后校正的 $Q$ 值。同时,根据 FPKM 值计算差异表达倍数(fold change,FC)。DEmRNAs 的筛选标准为 $Q<0.05$ 和 $|\log FC|>2$。

无论是新预测的还是已被数据库注释的 circRNA,目前绝大部分的 circRNA 都无法获得其完整的全长序列。只能使用 circRNA 序列上的“back-splicing”(反向剪切)位点部分的“junction reads”的数量来作为 circRNA 表达量的计算依据。通常使用 SRPBM(spliced reads per billion mapping)值来表征 circRNA 的表达水平[16],其计算公式如下:

$$SRPBM=\frac{number\ of\ circular\ reads}{total\ mapped\ reads\ (units\ in\ billion)}$$

差异表达分析与 mRNA 分析策略一样,也使用 edgeR 来计算。DEcircRNAs 的筛选标准为 |FC(fold change)|>2 和 $P<0.05$。

### 1.4 基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析

根据 circRNA 在基因组上的位置信息,可以获得与 circRNA 所在基因组位置上对应的蛋白编码基因的信息,这类基因被称为某一 circRNA 的“parental gene”(亲本基因)。为了探索 circRNA 相关 ceRNA 网络的潜在生物学机制,使用 R“ClusterProfiler”软件包[17]对 DEcircRNA 的亲本基因和 DEmRNA 进行基于 Gene Ontology,包括生物学过程(biological process,BP)、细胞成分(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)和 KEGG 途径的富集分析。$P$ 值<0.05 被认为具有统计学意义。

### 1.5 构建 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络

ceRNA 假说揭示了一种 RNA 间相互作用的新机制。mRNA 和 circRNA 可以通过竞争性的结合 miRNA 来调控彼此的表达。miRanda 是一种常用于检测基因组序列中潜在 microRNA 靶位点的算法[18]。匹配策略主要包括两个步骤:首先,在查询的 miRNA 序列和基因 3’UTR 序列间进行动态规划局部比对,基于序列互补性(而不是序列一致性)打分;然后,基于第一步获

得的高分比对结果(sc 参数控制),使用 RNAlib(来自 ViennaRNA 包)评估比对的热力学稳定性。最终能量小于阈值的匹配对象作为最终结果。在前面的结果中,获得了差异表达的 circRNA 和 mRNA。使用 miRanda 鉴定差异 circRNA 和 mRNA 的 microRNA 靶点,初步匹配条件为序列互补 Tot Score>140 和热力学稳定性 Tot Energy<-20。然后筛选出与 miRNAs 共调控的 DEmRNA 和 DEcircRNA。利用 miRanda 回归模型分析以及序列匹配的方法(筛选条件设置为 Sum max energy<-90)建立 miRNAs 的海绵吸附作用的调控网络。最后根据 DEcircRNAs 与对应 DEmRNAs 的协同表达来找到核心的 ceRNA 网络。并用 Cytoscape 软件 v.3.8.2[19]进行可视化。

### 1.6 基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)

GSEA 用于确定预先定义的基因集合在两种生物状态(如肿瘤和正常组织)之间是否显示出统计学差异[20]。基于“Molecular Signatures Database v7.4”,利用 GSEA 分析差异基因的潜在途径。基于“curated gene sets”确定丰富的 KEGG 途径、生物学过程、细胞成分和分子功能。最后,基于“immunologic signature gene sets”确定与肿瘤系统中细胞活性和应答相关的特定生物学状态或过程。根据默认的加权富集统计方法对数据进行归一化,以获得归一化富集得分(NES)。|NES|>2 和 $P<0.05$ 的基因集被认为具有统计学意义。

### 1.7 蛋白互作网络(Protein-Protein Interaction Networks, PPI)的构建和 HUB 基因的鉴定

使用中等置信度(0.400)的交互得分,利用在线网站 STRING[21-22]构建了一个基于 ceRNA 调控网络中靶基因的蛋白质-蛋白质相互作用网络。使用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化。随后,使用 cytoHubba 插件[23]识别前 10 个 HUB 基因。

### 1.8 基于 HUB 基因的预后价值构建关键的 circRNA 调控子网络

TARGET 数据库是目前最大的儿童肿瘤综合数据库。本研究从中下载了 136 个 WT 样本的 RNA 测序数据和相应的临床信息数据集。在生存结果分析中,根据 HUB 基因表达值的中位数将患者分为高表达组和低表达组。选择无病生存率(disease free survival, DFS)作为主要随访终点,使用 Kaplan-Meier 方法和基于 TARGET 数据集表达谱的单因素 Cox 回归分析来评估 HUB 基因的预后价值。最后,基于关键的 HUB 基因构建 WT 中的 circRNA 调控子网络。

### 1.9 RNA 测序结果的 PCR 验证

使用 Trizol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取每个肿瘤组织的 RNA。根据制造商的说明,使用 Simply P Total RNA Extraction Kit(BioFlux, China)提取细胞总 RNA。使用 NanodropOne(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,United States)测定 RNA 浓度。使用 PrimeScript™ RT 试剂盒(TaKaRa, Japan)对 circRNA 和 mRNA 进行反转录,并使用 TB Green® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ试剂盒(TaKaRa,Japan)进行扩增和定量。实时 PCR 在 CFX Connect Real-Time PCR Detection System 上操作。每个样本包含 3 个技术重复。GAPDH 用于 circRNA 和 mRNA 表达的标准化。目标基因的表达基于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。本研究使用的引物见表 1。

### 1.10 功能丧失实验

本研究选择 hsa_circ_0009035 在 WT 细胞系中进一步验证功能。针对 hsa_circ_0009035 后剪接位点的 siRNA 和阴性对照由 Hanbio(上海,中国)设计并合成。使用脂质体 2000 (Invitrogen,美国)进行细胞转染。根据制造商的说明步骤,采用 CCK-8 法(MCE, HY-K0301)检测细胞活力,并采用划痕法检测细胞迁移。使用基质凝胶(Biozellen,B-P-00002-4,中国)敷在 24 孔板小室(Falcon,353097,美国)中进行 Transwell 检测细胞侵袭。使用 BD 细胞周期检测试剂盒和流式细胞仪检测细胞周期时相分布。

### 1.11 数据分析

配对组织样本的基因表达差异分析采用配对 $t$ 检验(正态分布)或 Wilcoxon 配对检验(非正态分布)。使用 GraphPad Prism 8 对 PCR 实验结果进行分析。所有的生物信息学分析使用 R 软件 4.0.3 版进行。检验水准 $\alpha=0.05$。

**表 1 RT-qPCR 引物**

| RNA | 正义链(5′→3′) | 反义链(3′→5′) |
|---|---|---|
| hsa_circ_0001900 | CGTTCAGTGCCTCGAAAGAAC | CTGGTCCCCTTTCAGGATGAG |
| hsa_circ_0002563 | GAAGTTGGGCCTGGAAGTCTA | TGTCTTGCCACTTCCTGTCTG |
| hsa_circ_0006151 | GGCACCAGCATAGCCAGTAGT | GATGACCAGGCGCTTTTCACA |
| hsa_circ_0006549 | AGAATGTGGAAATAACGGAGCA | TCCGGTGGTAGGTTTCAACT |
| hsa_circ_0009035 | TTGCCTCTGGAGTATTGGAGT | AAGCTAATGTGTCCCTGTTGG |
| hsa_circ_0005015 | ACTGGGACGAAGTGTGGATT | GGCTTTGGATGATGAGGTGT |
| hsa_circ_0008122 | TGTCTCAAAGCCAGACCTGAT | ATTCTGTTGTTCGGTGTCCAG |
| circNPNT | AAGTTGGAGAGAGAAGGGAAC | TGGTCAGGTTTCTACTGTTATTTTG |
| hsa_circ_0072391 | GCTCGGATGTTGCTGAATGAC | AGCAGCGGTCTAATGCACTG |
| circEYA1 | CCTTGGACTGCGAATGGAAGA | TCTGAACCTCGACGCAATCG |
| circZNF208 | CAGAGCAGGGCATAGAAGATT | TTCTATGGCCACATCCCTAAA |
| circPKHD1 | TTGGATCTTACTCGTGTGCC | AAAGGAATCCACTTACCCTGG |
| TP53 | CGCTTCGAGATGTTCCGAGA | CTTCAGGTGGCTGGAGTGAG |
| LLGL1 | GGAACCTGGCAGAAGACGAG | AGCAGGCGTGGTTCTATGTT |
| KANK3 | CTCCGCTAGCGACATTCCAG | GGTCGGGCAGGTTCTGATT |
| TOP3A | CCCGAAGACCGTGCCTTTT | CTCATGCGACCGTTTGACAG |
| GAPDH | CCTTCCTGGGCATGGAGTC | TGATCTTCATTGTGCTGGGTG |

## 2 结果

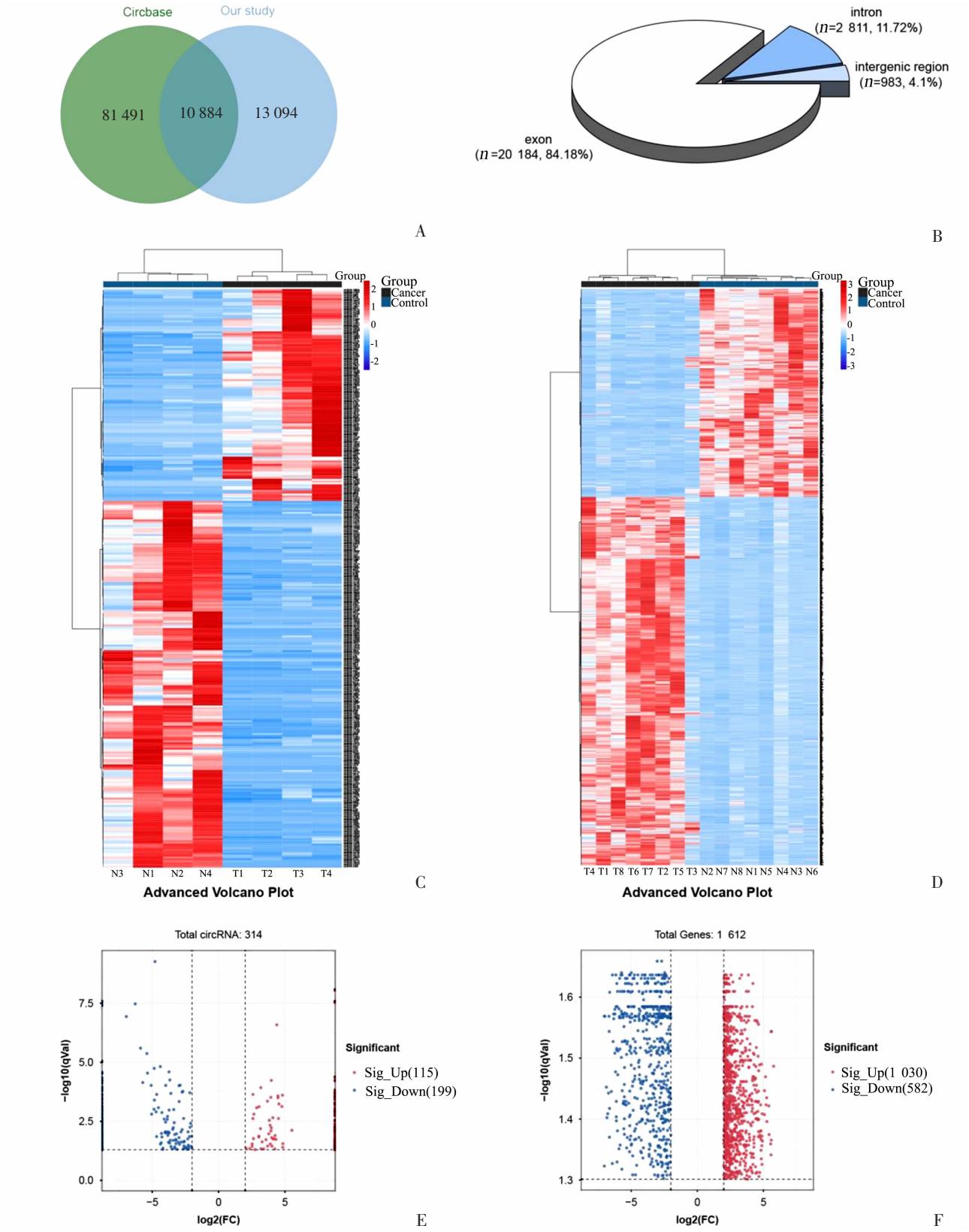
### 2.1 WT 中差异表达的 circRNA 和 mRNA 鉴定

对 4 对肾母细胞瘤和配对正常组织样本进行 circRNA 测序,共鉴定出 23 978 个 circRNA,其中 10 884 个 circRNA 在 circBase(http://www.circbase.org/)数据库中已获得注释(图 1A)。另外,结果显示大多数 circRNA(84.18%)由外显子组成,11.72%由内含子组成,而 4.10%定位于基因间区(图 1B)。这里排除了来自基因间区的 circRNA(目前认为该类 circRNA 无功能)。通过热图显示了筛选到的 DEcircRNA 的特异性表达(图 1C),层次聚类分析显示在 WT 中大多数 DEcircRNA 低表达。DEcircRNA 的分布通过火山图显示(图 1E),总共鉴定出 314 个 DEcircRNA,其中 115 个上调、199 个下调。同样,本研究额外对 8 对配对的肾母细胞瘤组织进行了测序,分析了 mRNA 表达谱。根据筛选标准,检测到 1 030 个上调和 582 个下调差异表达基因。图 1D 展示了肿瘤和正常组织的基因表达热图,图 1F 展示了差异表达基因的火山图。

为了验证 circRNA 测序结果,随机选择了 12 个 DEcircRNA(8 个上调,4 个下调)设计了跨越 circRNA 后剪接位点的特异性发散引物进行组织验证(DEcircRNA 的详细特征见表 2)。RT-qPCR 结果显示其中 7 个 DEcircRNA 显示出显著的表达差异(图 2)。

### 2.2 DEmRNA 和 DEcircRNA 亲本基因的 GO 和 KEGG 途径富集分析

为了发现 DEcircRNA 和 DEmRNA 的潜在功能,对 DEcircRNA 亲本基因和 DEmRNA 分别进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析。DEcircRNA 亲本基因 GO 和 KEGG 通路富集分析结果如图 3A、C。GO 注释分析表明 DEcircRNA 亲本基因主要定位于细胞质和外泌体,参与信号转导、细胞增殖和细胞周期等过程。KEGG 途径富集分析表明,DEcircRNA 亲本基因主要富集在多条癌症相关的途径中。此外,本研究对 DEmRNA 同样进行基于 GO 和 KEGG 的富集分析。对于 GO 注释(图 3B),与恶性表型相关的生物学过程显著丰富,包括 DNA 复制、细胞分裂、细胞周期和细胞增殖等过程。KEGG 途径(图 3D)富集分析表明,DEmRNA 主要集中在细胞增殖、代谢和生长的信号通路上,另外肿瘤相关信号通路如 *P*53 信号通路和多条代谢通路也得到了富集。

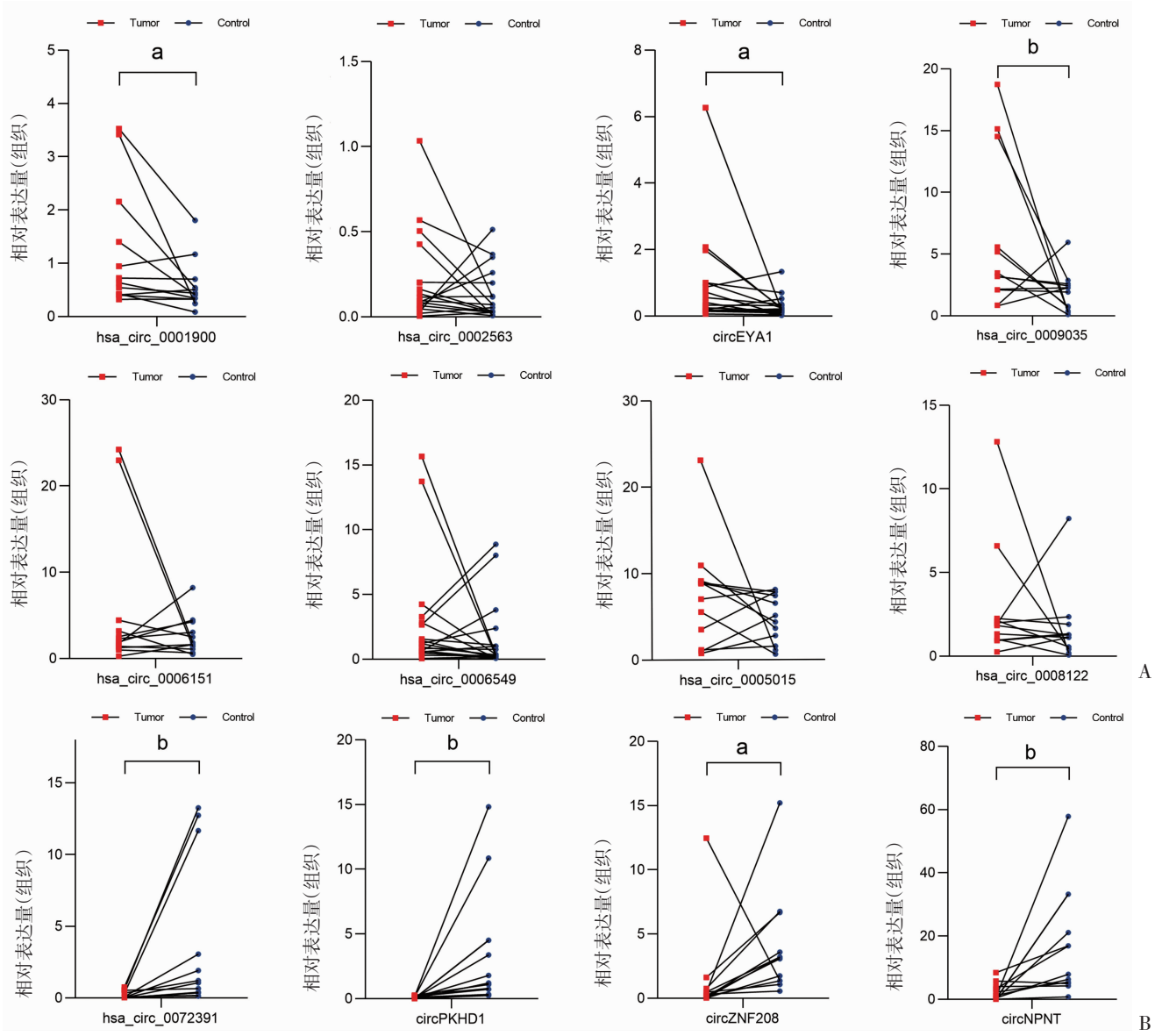



A:circRNA 测序数据与 circBase 数据库的比较韦恩图;B:环状 RNA 分类;C:DEcircRNA 的热图和聚类分析(每一行代表一个 circRNA,每一列代表一个样本;-2、-1、0、1 和 2 表示差异倍比;红色代表高表达,蓝色代表低表达,T:肿瘤样本,N:正常样本);D:DEmRNA 的热图和聚类分析;E:DEcircRNA 的火山图(红点代表上调的 circRNA,蓝点代表下调的 circRNA;水平虚线表示 $Q$ 值为 0.05,垂直虚线表示 2 倍的 logFC);F:DEmRNA 的火山图

**图 1 基于 RNA 高通量测序分析 WT 中差异表达 circRNA 和 mRNA**

**表 2　拟 PCR 验证的 DEcircRNA 的基本特征**

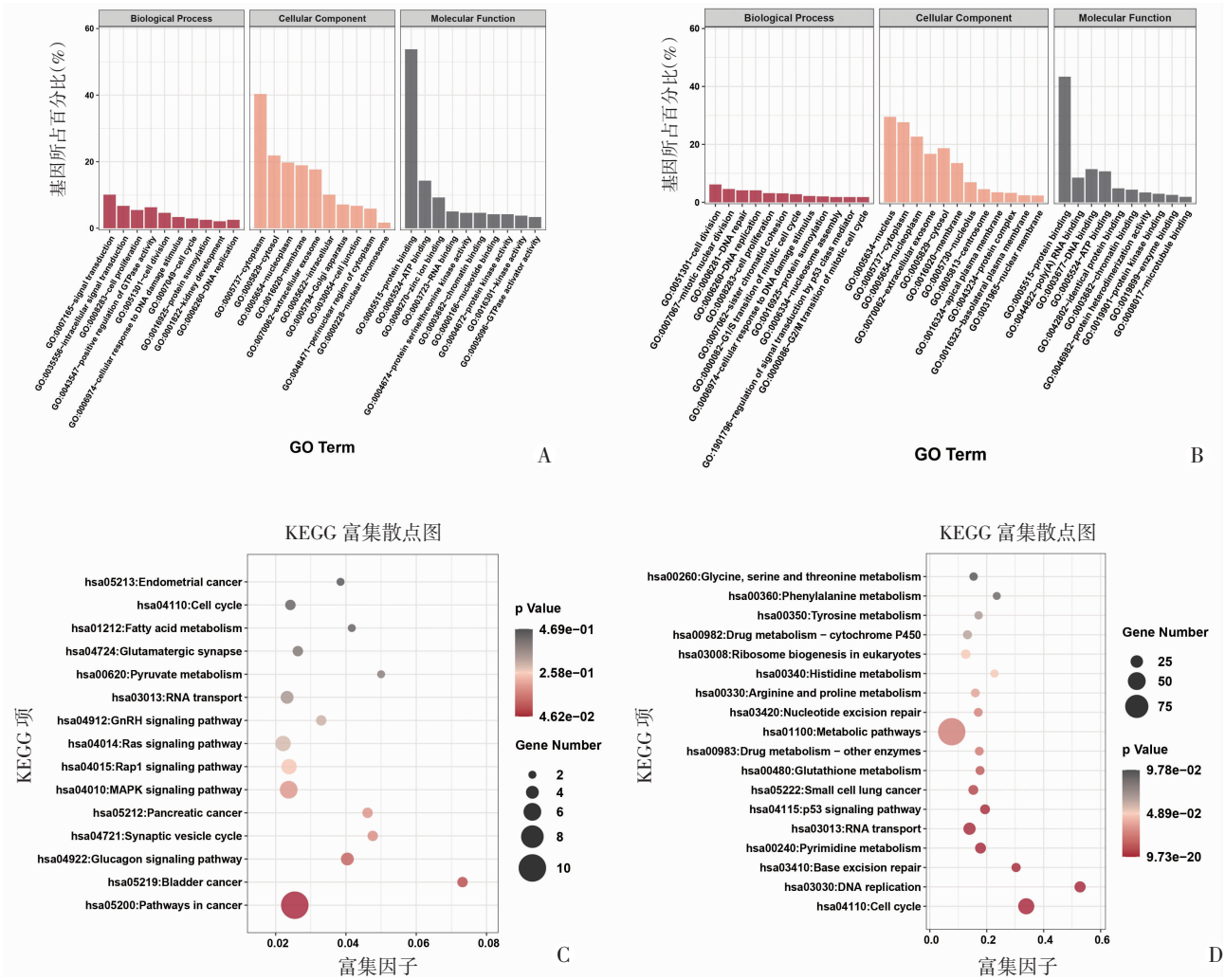
| circRNA 环状 RNA 名称 | 位置 | 剪接方向 | 亲本基因长度 | 剪接长度 | 亲本基因 ID | 基因符号 | 表达趋势 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| circZNF208 | chr19:21974729-21988909 | - | 14 181 | 302 | ENSG00000160321 | ZNF208 | Down |
| hsa_circ_0006549 | chr8:124392768-124392917 | - | 149 | 149 | ENSG00000156802 | ATAD2 | Up |
| circEYA1 | chr8:71244603-71271897 | - | 27 295 | 314 | ENSG00000104313 | EYA1 | Up |
| hsa_circ_0009035 | chr12:49991998-49992655 | - | 658 | 375 | ENSG00000161800 | RACGAP1 | Up |
| circPKHD1 | chr6:52010309-52035721 | - | 25 413 | 638 | ENSG00000170927 | PKHD1 | Down |
| circNPNT | chr4:105911149-105911732 | + | 584 | 584 | ENSG00000168743 | NPNT | Down |
| hsa_circ_0002563 | chr1:44757556-44758140 | + | 585 | 247 | ENSG00000142945 | KIF2C | Up |
| hsa_circ_0008122 | chr19:23134080-23136043 | + | 1 964 | 223 | ENSG00000183850 | ZNF730 | Up |
| hsa_circ_0001900 | chr9:135881633-135883078 | - | 1 446 | 425 | ENSG00000130559 | CAMSAP1 | Up |
| hsa_circ_0006151 | chr10:68468123-68470163 | - | 2 041 | 367 | ENSG00000138346 | DNA2 | Up |
| hsa_circ_0072391 | chr5:43295752-43297166 | - | 1 415 | 331 | ENSG00000112972 | HMGCS1 | Down |
| hsa_circ_0005015 | chr8:121628714-121629340 | - | 627 | 627 | ENSG00000170961 | HAS2 | Up |




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;红点代表肿瘤样本,蓝点代表正常样本

A:上调的 DEcircRNA 在配对肿瘤组织中的表达水平;B:下调的 DEcircRNA 在配对肿瘤组织中的表达水平

**图 2　DEcircRNA 的表达水平验证**　($n=12$,$\bar{x}\pm s$)




A:DEcircRNA 亲本基因的 GO 富集分析;B:DEmRNA 的 GO 富集分析;C:DEcircRNA 亲本基因的 KEGG 富集分析;D:DEmRNA 的 KEGG 富集分析

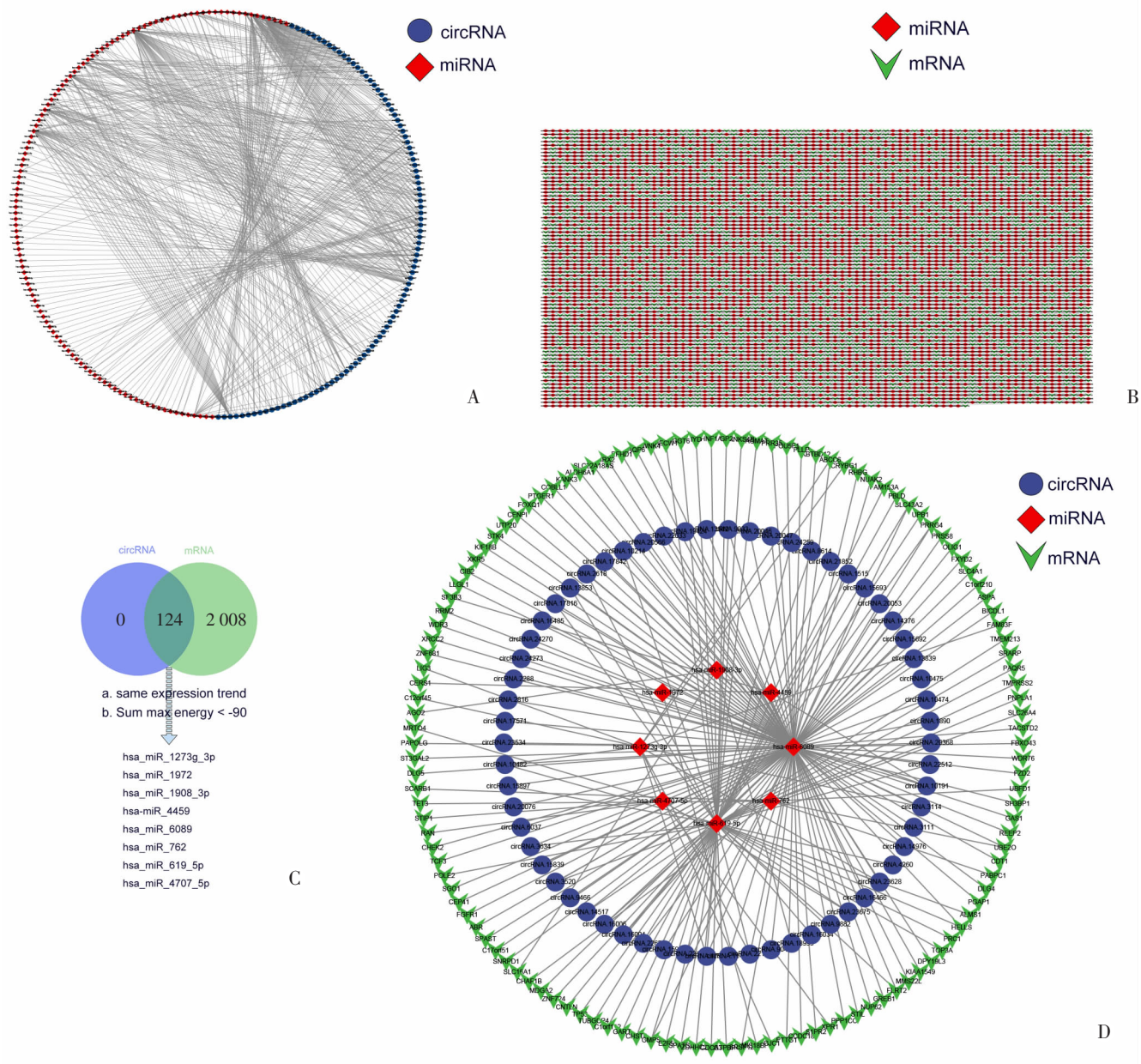
**图 3 DEcircRNA 亲本基因与 DEmRNA 的 GO 和 KEGG 富集分析**

### 2.3 WT 中 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络的构建

为了预测所有 DEcircRNA 和 DEmRNA 的潜在靶点 miRNA,使用 miRanda 预测工具分别识别 314 个 DEcircRNA 和 1 612 个 DEmRNA 的 miRNA 靶点。构建了 DEcircRNA-miRNA 和 DEmRNA-miRNA 相互作用网络(图 4A、B)。通过整合 circRNA-miRNA 对和 miRNA-mRNA 对,基于相同 miRNA 结合位点构建了一个完整的 circRNA-miRNA-mRNA 网络。根据 ceRNA 理论,本研究选择 circRNA 和 mRNA 具有协同表达趋势的 ceRNA 网络,并将筛选条件设置为 Sum max energy<-90(绝对值越大越严格)。最终,构建了一个精确的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络,其中包括 62 个 circRNA、8 个 miRNA 和 127 个 mRNA,并随后通过 Cytoscape 进行可视化(图 4C、D)。

### 2.4 ceRNA 网络中靶基因的 GSEA 富集和 PPI 网络分析

为了研究 ceRNA 调控网络在 WT 中的潜在生物学功能,基于所涉及的 127 个 DEmRNA 进行 GSEA 分析。结果发现 DEmRNA 的富集通路见图 5A,尤其是主要与细胞周期相关。值得注意的是,基于免疫背景基因集的富集分析显示 DEmRNA 与多种免疫细胞的活性有关(图 5B)。结果表明,这些 DEmRNA 在一定程度上参与了肿瘤的发生发展,特别是与细胞周期和免疫应答有关。为了探索关键的 HUB 基因,基于 STRING 数据库建立了包含 127 个点和 170 个连接的 PPI 网络(图 5C)。前 10 个 HUB 基因,包括 *TP*53、*KANK*3、*STIL*、*RRM*2、*HELLS*、*POLE*2、*TOP*3*A*、*LLGL*1、*GMPS* 和 *GTPBP*4 被鉴定(图 5D)。




A:circRNA-miRNA 调控网络;B:miRNA-mRNA 调控网络;C:circRNA 和 mRNA 的 miRNA 靶点交集;D:ceRNA 调控网络

**图 4 肾母细胞瘤中 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络的构建**

### 2.5 基于 HUB 基因的预后特征构建关键的 ceRNA 调控子网络

在鉴定的前 10 个 HUB 基因中,除 *KANK3* 外,其余 HUB 基因都呈表达上调趋势(图 6A)。为验证 HUB 基因的预后价值,通过单因素 COX 回归分析 10 个 HUB 基因对 WT 患者远期生存率的影响(图 6B)。结果显示 4 个 HUB 基因包括 *TP53*、*KANK3*、*LLGL1* 和 *TOP3A* 的 mRNA 表达水平与 WT 患者的 RFS(无病生存率)显著相关(图 6C)。结果提示这 4 个基因可能在 WT 的进展和预后中起关键作用。最后,基于这 4 个 HUB 基因的重要性,进一步构建了靶向该基因的子网络(图 6D)。RT-qPCR 用于验证 4 个 HUB 基因的表达水平,结果显示出与测序数据一致的趋势(图 6E)。

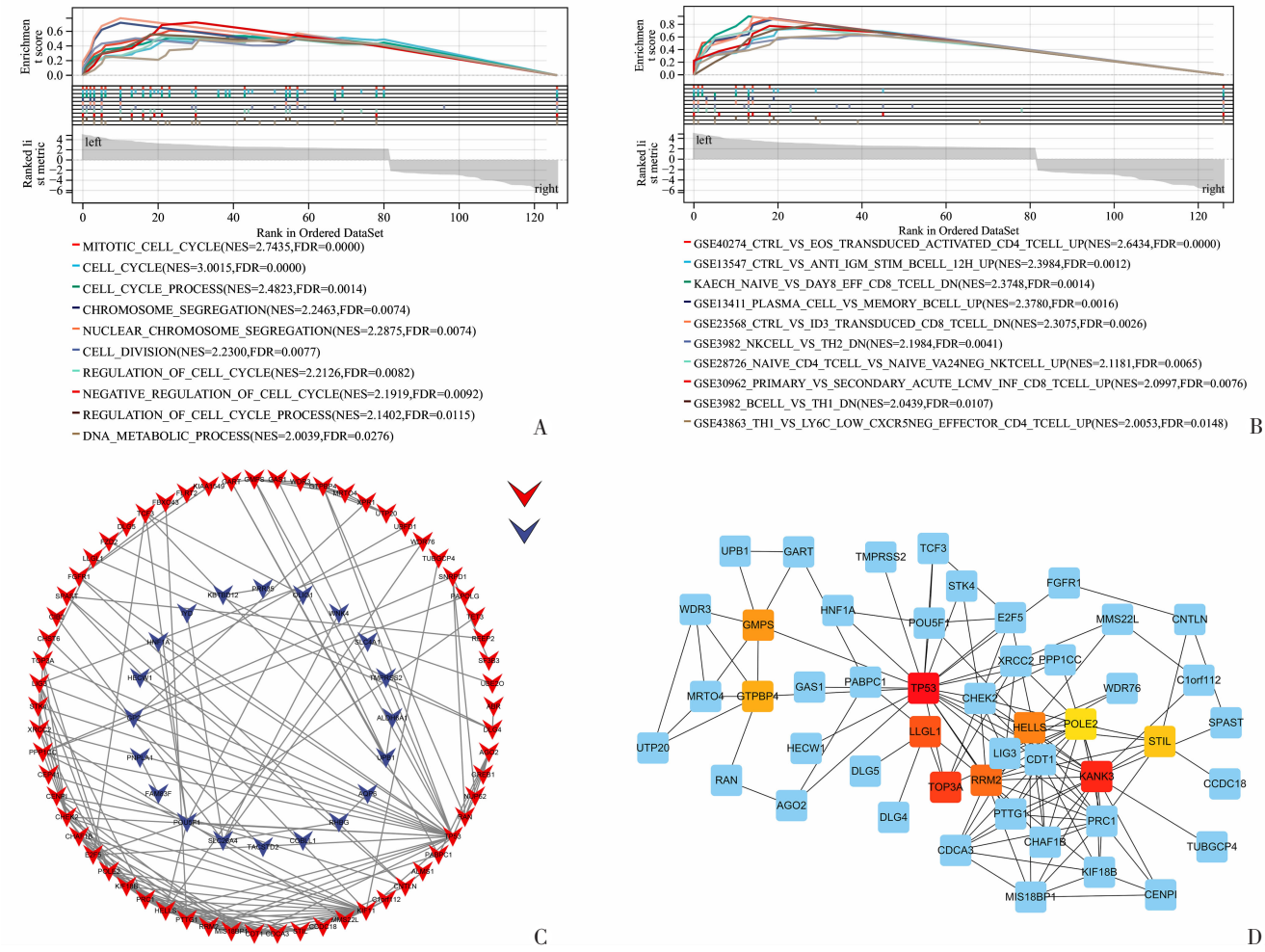
### 2.6 沉默 hsa_circ_0009035 抑制 WT 细胞的增殖、侵袭和迁移

本研究选择子网络中的 hsa_circ_0009035 进行进一步的功能验证。如前所述,与邻近的非肿瘤组织相比,hsa_circ_0009035 在 WT 组织中高表达。PCR 产物的 Sanger 测序验证了其反向剪接位点(图 7A)。为了

研究 hsa_circ_0009035 在 WT 进展中的作用,本研究设计了特异性沉默 hsa_circ_0009035 的 siRNA。siRNA 片段通过靶向 hsa_circ_0009035 的反向剪接位点敲低目的环状 RNA 的表达水平。与阴性对照相比,hsa_circ_0009035 的沉默显著降低了 WIT-49 细胞中的 RNA 水平(图 7B)。通过 CCK-8 实验,沉默 hsa_circ_0009035 显著抑制了 WT 细胞的增殖能力(图 7C)。此外,沉默 hsa_circ_0009035 后,细胞的迁移和侵袭能力下降(图 7D、E)。细胞周期分布分析显示,hsa_circ_0009035 沉默后,$G_1$ 期细胞比例明显减少,S 期细胞比例增加(图 7F)。以上结果表明构建的环状 RNA 网络在 WT 进展中具有潜在作用。

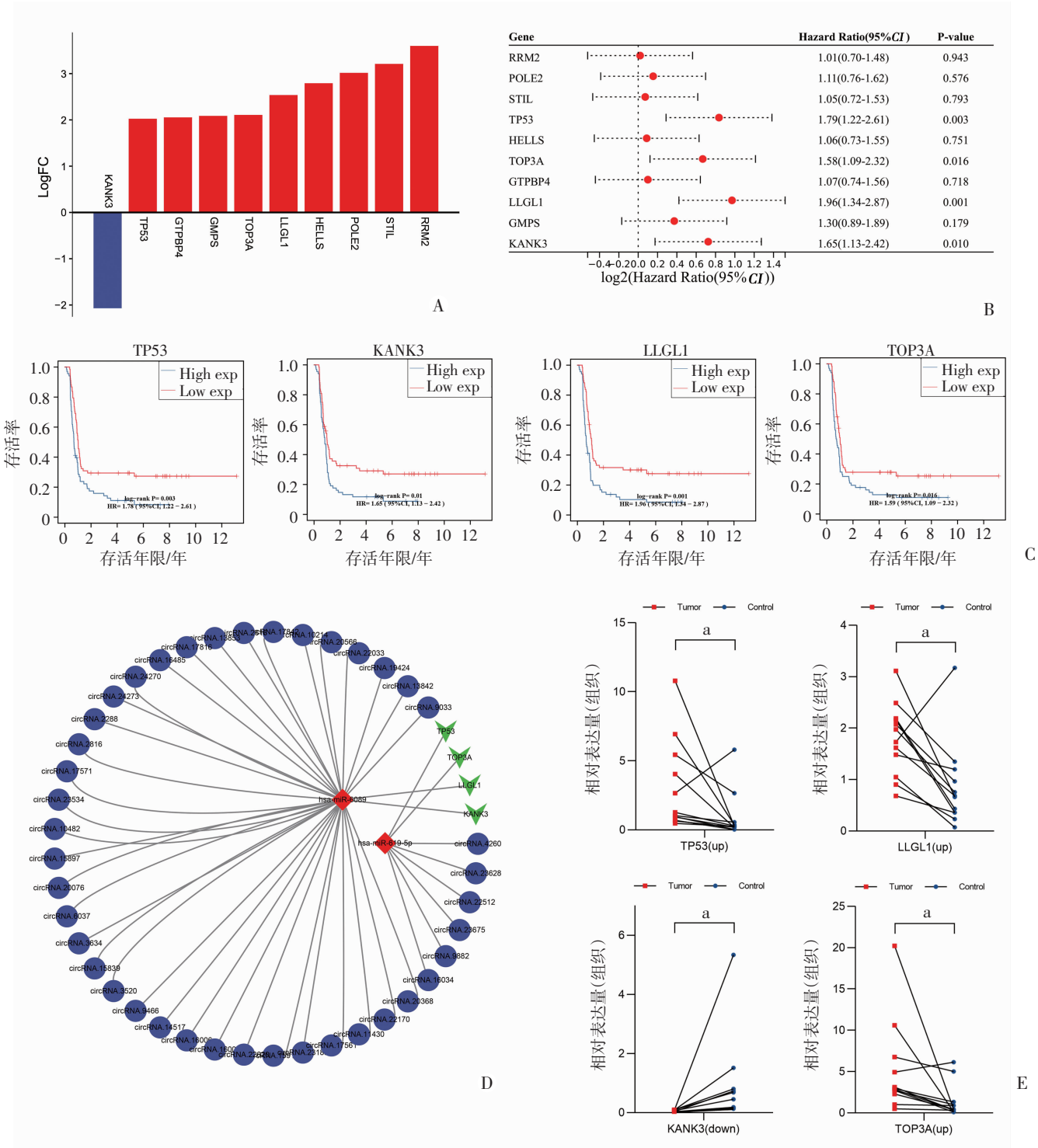
## 3　讨论

当前对 WT 的治疗已取得进展,但影响其发生和发展的具体机制仍不明确,特别是在 circRNA 领域。因此,探讨 WT 发生发展的分子机制,并识别有效的生物标志物对 WT 患者更好的治疗和更好的整体预后具有重要意义。近年来,ceRNA 网络假说引起了研究者的极大兴趣,它将蛋白质编码的 mRNA 与非编码的 RNA 联系起来。根据 ceRNA 假说,circRNA 可以作为 miRNA 海绵来影响下游 mRNA 的表达[15-16]。越来越多的证据表明,circRNA 及其介导的 ceRNA 调控网络在多种人类癌症的发病和进展中发挥着至关重要的作用[24]。例如,hsa_circ_0014130 作为 miR-132-3p 的海绵,通过调控 *KCNJ*12 的表达,促进膀胱癌的肿瘤发生和转移[25];circAGFG1 作为 miR-195-5p 的海绵,通过调节 *CCNE*1 的表达,促进三阴性乳腺癌的进展[26]。因此,为了探索 circRNA 相关的 ceRNA 网络在 WT 发生发展过程中的潜在机制,本研究基于临床肿瘤样本的测序数据构建了 WT 中一个潜在的 circRNA-miRNA-mRNA ceRNA 调控网络。



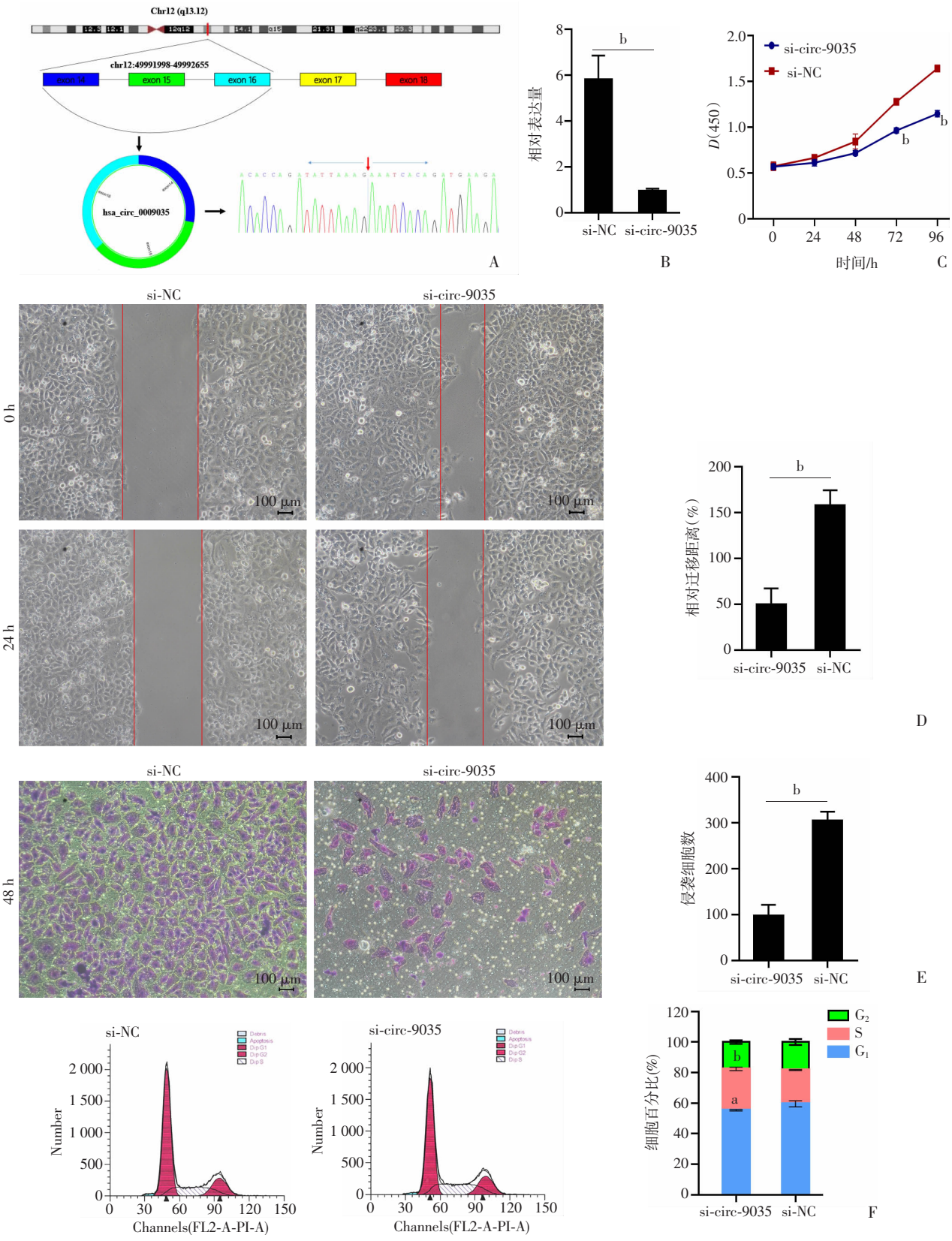

A:基于 C5 策划基因集对 ceRNA 网络中 DEmRNA 的 GSEA 分析;B:基于免疫特征基因集对 ceRNA 网络中 DEmRNA 的 GSEA 分析;C:ceRNA 网络中 DEmRNA 的 PPI 网络;D:通过 cytoHubba 插件鉴定前 10 个 HUB 基因

**图 5　ceRNA 网络中靶基因的 GSEA 富集和 PPI 网络分析**




A:前 10 个 HUB 基因表达变化柱状图(红色柱代表上调基因,蓝色柱代表下调基因);B:森林图显示单因素 Cox 回归分析中 HUB 基因的 mRNA 表达水平与 WT 患者预后的关联;C:与 WT 患者预后显著相关的 4 个 HUB 基因的生存曲线;D:基于 4 个与预后显著相关的 HUB 基因构建 ceRNA 调控子网络;E:对关键 HUB 基因的 RT-qPCR 验证($n=12$,$\bar{x}\pm s$)　红点代表肿瘤样本,蓝色代表正常样本;a:$P<0.01$

**图 6　基于 HUB 基因的预后特征构建关键的 ceRNA 调控子网络**




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:通过 Sanger 测序验证 hsa_circ_0009035 的反向剪接位点;B:靶向后剪接位点的 siRNA 转染后,通过 qRT-PCR 检测 hsa_circ_0009035 的表达水平;C:用 CCK-8 法检测 WIT-49 细胞的增殖;D、E:通过划痕实验和 Transwell 实验观察 WIT-49 细胞的迁移和侵袭;F:沉默 hsa_circ_0009035 后诱导细胞周期阻滞在 S 期

**图 7 沉默 hsa_circ_0009035 可抑制 WT 细胞的增殖、侵袭和迁移** ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

### 3.1 RNA 测序揭示 WT 中 circRNA 和 mRNA 的差异表达

到目前为止,还没有研究报道 WT 肿瘤和正常组织之间 DEcircRNA 的全面表达。通过下一代测序技术本研究系统性地分析了 WT 的 circRNA 表达谱。通过 circBase 数据库比对,超过一半的 circRNA(54.61%)为新发现。根据方法中的筛选标准,共检测到 314 个 DEcircRNA(115 个上调,199 个下调)。为了验证测序结果,本研究随机选择了 12 个 DEcircRNA 在临床肿瘤组织中进行 RT-qPCR 验证,结果其中 7 个 DEcircRNA 呈现出与测序结果一致的表达趋势。另外,本研究也分析了 WT 肿瘤和配对正常组织之间的 mRNA 差异表达,共检测到 1 612 个 DEmRNA(1 030 个上调,582 个下调)。有趣的是大多数 DEcircRNA(63.38%)下调,而大多数 DEmRNA(63.90%)上调。这些结果暗示一个复杂的 ceRNA 调控网络。

GO 富集和 KEGG 途径分析表明,DEcircRNA 亲本基因富集到多条癌症相关的途径中,参与细胞增殖和细胞周期等恶性生物学相关过程。GO-CC 分析提示 DEcircRNA 亲本基因主要定位于细胞质中。一般认为,大部分外显子来源的 circRNA 主要定位在细胞质中发挥转录后调控功能。值得一提的是外泌体中也有大量富集。最近的研究揭示了 circRNA 在外泌体中具有稳定的富集[27]。不仅如此,越来越多的研究表明外泌体来源的 circRNA 在多种肿瘤中充当预后标志物,并调控肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和化疗耐药[28-32]。以上证据支持 circRNA 通过外泌体运输的方式参与调控 WT 的肿瘤微环境。GO 和 KEGG 通路分析也用于注释 WT 中的 DEmRNA。结果显示 DEmRNA 参与调控细胞分裂、细胞周期、细胞增殖以及代谢和经典的 *P*53 通路等生物过程,这些信号通路已被证实可以调节细胞的行为和结局。结果表明,DEcircRNA 和 DEmRNA 在多种癌症相关功能通路中起着关键作用,并进一步表明 circRNA 相关的 ceRNA 网络可能参与了 WT 的发生和发展。

### 3.2 WT 中 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络的构建

越来越多的研究发现,circRNA 可以作为 miRNA 海绵间接调控基因表达。因此,为了揭示 DEcircRNA 在 WT 中的详细作用和机制,本研究整合了 circRNA-miRNA 和 mRNA-miRNA 相互作用对,构建了由 62 个 circRNA、8 个 miRNA 和 127 个 mRNA 组成的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络。为了了解 ceRNA 网络中的 mRNA 靶点在 WT 发生和发展中的潜在途径和生物学功能,本研究进行了 GSEA 分析。GSEA 可以检测基因集合而不是单个基因的富集途径。富集结果主要与细胞周期有关。值得注意的是,这些 mRNA 靶点还富集到多种免疫细胞活性路径。如上所述,结果表明 ceRNA 网络中的 mRNA 靶点可能通过细胞周期和免疫途径调控 WT 的发生发展。

为了进一步确定关键的调控网络,基于 STRING 数据库建立了 PPI 网络,并筛选了 10 个 HUB 基因。除了 *KANK*3 在 WT 下调外,其余 HUB 基因均呈上调。单因素 Cox 分析发现,ceRNA 网络中的靶分子 *TP*53、*KANK*3、*LLGL*1 和 *TOP*3*A* 是 WT 患者预后不良的危险因素。进一步表明它们在 WT 进展中具有重要的生物学作用。

### 3.3 体外实验验证 circRNA 调控网络的潜在功能

通过在 PubMed 上搜索这些基因,本研究发现既往的研究已经报道了他们在恶性肿瘤发生中的可能机制。*TP*53 在多种癌症中均有高表达,并可作为多种癌症的诊断和预后标志物[33]。此外 *P*53 也被报道作为 circRNA 的调控靶点,例如一项最近的研究显示 circCNTNAP3 的过表达抑制了 *P*53 野生型食管鳞状细胞癌 ESCC 细胞的增殖同时增加细胞凋亡,机制上通过海绵 miR-513a-5p 从而促进 *P*53 的表达[34]。相对而言,*KANK*3 的研究较少,KIM 等[35]发现 *KANK*3 的下调增强了肝细胞癌的细胞迁移和侵袭,生物信息学分析表明 *KANK*3 下调与多种癌症的不良预后相关。有趣的是,*KANK*3 已被确定为 *P*53 的缺氧诱导的促凋亡靶点[36]。*LLGL*1 也被称为 *Lgl*1、*HUGL*1 或 *HUGL*-1。该基因已被报道通过调节细胞增殖、侵袭、细胞凋亡和化疗药物耐药性等生物学过程在多种恶性肿瘤中发挥致癌作用,比如胰腺导管癌[37]、非小细胞肺癌[38]、神经胶质瘤[39]和食管癌[40]。*LLGL*1 还被报道作为多种癌症的预后标志物[41-44]。*TOP*3*A* 编码一种 DNA 拓扑异构酶。有研究报道了该基因在癌症中的作用,例如该基因与 *P*53 相互作用并有助于 *P*53 介导的肿瘤抑制[45]。另一项研究则发现 *TOP*3*A* 的表达与口腔鳞状细胞癌癌症干细胞和免疫表型之间存在相关性,然而并未显示出该基因在口腔鳞状细胞癌中的预后意义[46]。最后,基于关键 HUB 基因的重要性,使用 RT-qPCR 在临床来源的肿瘤组织中验证了他们的差异表达水平。此外,功能分析显示,hsa_circ_0009035 的沉默抑制了 WT 细胞的增殖、侵袭和迁移,提示 hsa_circ_0009035 在 WT 细胞恶性进展中的作用。这些发现有力地证明了环状 RNA 在 WT 中不可或缺的作用。

本研究确定了 WT 中的 circRNA 表达谱并构建了 circRNA 相关调控网络。该网络可能参与调控 WT 的发生发展。本研究为阐明 WT 的发病机制提供了新的见解,并提出了值得进一步研究的潜在调控机制。

## 参考文献:


[1] DAVIDOFF A M. Wilms tumor[J]. Curr Opin Pediatr, 2009, 21(3): 357. DOI: 10.1097/MOP.0b013e32832b323a.

[2] DOME J S, GRAF N, GELLER J I, *et al*. Advances in wilms tumor treatment and biology: progress through international collaboration[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 2999-3007. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.1888.

[3] BECKWITH J B, PALMER N F. Histopathology and prognosis of Wilmstumors: results from the First National Wilms' Tumor Study[J]. Cancer, 1978, 41(5): 1937-1948. DOI: 10.1002/1097-0142(197805)41: 5 < 1937: aid-cncr2820410538>3.0.co;2-u.

[4] SPREAFICO F, PRITCHARD JONES K, MALOGOLOWKIN M H, *et al*. Treatment of relapsed Wilms tumors: lessons learned[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9(12): 1807-1815. DOI: 10.1586/era.09.159.

[5] MALOGOLOWKIN M, SPREAFICO F, DOME J S, *et al*. Incidence and outcomes of patients with late recurrence of Wilms' tumor[J]. Pediatr Blood Cancer, 2013, 60(10): 1612-1615. DOI: 10.1002/pbc.24604.

[6] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0030733.

[7] 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. DOI: 10.1038/nature11928.

[8] 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. DOI: 10.1038/nature11993.

[9] KO E Y, RITCHEY M L. Current management of Wilms' tumor in children[J]. J Pediatr Urol, 2009, 5(1): 56-65. DOI: 10.1016/j.jpurol.2008.08.007.

[10] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, *et al*. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.

[11] GAO Y, WANG J F, ZHAO F Q. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification[J]. Genome Biol, 2015, 16(1): 4. DOI: 10.1186/s13059-014-0571-3.

[12] GLAŽAR P, PAPAVASILEIOU P, RAJEWSKY N. circBase: a database for circular RNAs[J]. RNA, 2014, 20(11): 1666-1670. DOI: 10.1261/rna.043687.113.

[13] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat Methods, 2015, 12(4): 357-360. DOI: 10.1038/nmeth.3317.

[14] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nat Methods, 2015, 12(1): 59-60. DOI: 10.1038/nmeth.3176.

[15] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.

[16] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, *et al*. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981-984. DOI: 10.1038/cr.2015.82.

[17] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, *et al*. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.

[18] ENRIGHT A J, JOHN B, GAUL U, *et al*. microRNA targets in *Drosophila*[J]. Genome Biol, 2003, 5(1): R1. DOI: 10.1186/gb-2003-5-1-r1.

[19] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, *et al*. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.

[20] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, *et al*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.

[21] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, *et al*. STRIG v11: protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.

[22] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, *et al*. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362-D368. DOI: 10.1093/nar/gkw937.

[23] CHIN C H, CHEN S H, WU H H, *et al*. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. BMC Syst Biol, 2014, 8(Suppl 4): S11. DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.

[24] ZHONG Y X, DU Y J, YANG X, *et al*. Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 79. DOI: 10.1186/s12943-018-0827-8.

[25] LI G, GUO B Y, WANG H D, *et al*. CircRNA hsa_circ_

0014130 function as a miR-132-3p sponge for playing oncogenic roles in bladder cancer via upregulating KCNJ12 expression[J]. Cell Biol Toxicol, 2021: 1-18. DOI: 10.1007/s10565-021-09668-z.

[26] YANG R, XING L, ZHENG X Y, *et al*. The circRNA circAGFG1 acts as a sponge of miR-195-5p to promote triple-negative breast cancer progression through regulating CCNE1 expression[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 4. DOI: 10.1186/s12943-018-0933-7.

[27] WANG Y X, LIU J B, MA J F, *et al*. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 116. DOI: 10.1186/s12943-019-1041-z.

[28] XIE M Y, YU T, JING X M, *et al*. Exosomal circSHKBP$_1$ promotes gastric cancer progression via regulating the miR-582-3p/HUR/VEGF axis and suppressing HSP90 degradation[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 112. DOI: 10.1186/s12943-020-01208-3.

[29] SHANG A Q, GU C Z, WANG W W, *et al*. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer *via* the miR-142-3p/miR-506-3p- TGF-β1 axis[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 117. DOI: 10.1186/s12943-020-01235-0.

[30] HUANG X Y, HUANG Z L, HUANG J, *et al*. Exosomal circRNA-100338 promotes hepatocellular carcinoma metastasis *via* enhancing invasiveness and angiogenesis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 20. DOI: 10.1186/s13046-020-1529-9.

[31] WANG X Y, ZHANG H Y, YANG H O, *et al*. Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through the miR-122-PKM2 axis in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2020, 14(3): 539-555. DOI: 10.1002/1878-0261.12629.

[32] DING C Y, YI X H, WU X Y, *et al*. Exosome-mediated transfer of circRNA CircNFIX enhances temozolomide resistance in glioma[J]. Cancer Lett, 2020, 479: 1-12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.03.002.

[33] SUN H, LIU S Y, ZHOU J Y, *et al*. Specific TP53 subtype as biomarker for immune checkpoint inhibitors in lung adenocarcinoma[J]. EBioMedicine, 2020, 60: 102990. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102990.

[34] WANG H, SONG X M, WANG Y J, *et al*. CircCNTNAP3-TP53-positive feedback loop suppresses malignant progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 1010. DOI: 10.1038/s41419-020-03217-y.

[35] KIM I, KANG J, GEE H Y, *et al*. A novel HIF1AN substrate KANK$_3$ plays a tumor-suppressive role in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(3): 303-312. DOI: 10.1002/cbin.10895.

[36] LESZCZYNSKA K B, FOSKOLOU I P, ABRAHAM A G, *et al*. Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity *via* AKT[J]. J Clin Invest, 2015, 125(6): 2385-2398. DOI: 10.1172/JCI80402.

[37] ZHU Y X, LI C H, LI G L, *et al*. LLGL1 regulates gemcitabine resistance by modulating the ERK-SP1-OSMR pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 10(4): 811-828. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.06.009.

[38] YANG W H, ZHOU C C, LUO M, *et al*. miR-652-3p is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes proliferation and metastasis by directly targeting Lgl1[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 16703-16715. DOI: 10.18632/oncotarget.7697.

[39] LIU X J, LU D, MA P, *et al*. Hugl-1 inhibits glioma cell growth in intracranial model[J]. J Neurooncol, 2015, 125(1): 113-121. DOI: 10.1007/s11060-015-1901-3.

[40] SONG J, PENG X L, JI M Y, *et al*. Hugl-1 induces apoptosis in esophageal carcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(26): 4127-4136. DOI: 10.3748/wjg.v19.i26.4127.

[41] MATSUZAKI T, TAKEKOSHI S, TORIUMI K, *et al*. Reduced expression of hugl 1 contributes to the progression of lung squamous cell carcinoma[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2015, 40(4): 169-177.

[42] LU X F, FENG X J, MAN X B, *et al*. Aberrant splicing of Hugl-1 is associated with hepatocellular carcinoma progression[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3287-3296. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2078.

[43] TSURUGA T, NAKAGAWA S, WATANABE M, *et al*. Loss of Hugl-1 expression associates with lymph node metastasis in endometrial cancer[J]. Oncol Res, 2007, 16(9): 431-435. DOI: 10.3727/000000007783980855

[44] BIESTERFELD S, KAUHAUSEN A, KOST C, *et al*. Preservation of HUGL-1 expression as a favourable prognostic factor in pancreatic carcinoma[J]. Anticancer Res, 2012, 32(8): 3153-3159.

[45] HSIEH M Y, FAN J R, CHANG H W, *et al*. DNA topoisomerase Ⅲ alpha regulates p53-mediated tumor suppression[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(6): 1489-1501. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1997.

[46] OLIVEIRA-COSTA J P, OLIVEIRA L R, DA SILVEIRA G G, *et al*. Topoisomerase expression in oral squamous cell carcinoma: relationship with cancer stem cells profiles and lymph node metastasis[J]. J Oral Pathol Med, 2012, 41(10): 762-768. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2012.01174.x.

(收稿:2022-04-29;修回:2022-06-06)

(编辑 栾 嘉)