

## 神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002542

## CircFLNB在骨髓源性细胞中的表达鉴定及功能分析

陈 希,赵晓晴,张 可

(中国医科大学生命科学院发育细胞生物教研室,沈阳 110000)

**【摘要】目的:**探讨环状 RNA hsa\_circ\_0066336(circFLNB)在骨髓源性细胞中的表达,并分析其潜在功能。**方法:**选择骨髓源性细胞 THP-1 和 Jurket 作为模式细胞,通过设计背对背引物获得 circRNA,分析 circRNA 在 2 种模式细胞中表达的差异。采用 T-A 克隆手段构建质粒,进行测序、比对。用 Arraystar 软件预测 hsa\_circ\_0066336 的靶标 miRNA。从 THP-1 细胞中提取靶标 miRNA 后反转录,再以 Real-time PCR 检测。**结果:**①在 THP-1 和 Jurket 细胞中成功扩增出 circFLNB,结果显示其表达在 2 种模式细胞中没有统计学差异( $P=0.105$ )。②克隆出含有 hsa\_circ\_0066336 的质粒,测序比对后找到了反向环状剪切位点。③通过 Arraystar 软件预测了 hsa\_circ\_0066336 靶向的 5 个 miRNA,并检测到靶标 miRNA 的表达。**结论:**CircFLNB 是表达在骨髓源性细胞中的一个环状 RNA,通过对其下游靶向 miRNA 功能的了解,推断 circFLNB 可能会参与多种疾病的发生。

**【关键词】**环状 RNA; hsa\_circ\_0066336; 骨髓源性细胞; 微小 RNA

**【中图分类号】**R329.2

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2020-03-01

Expression identification and functional analysis of circFLNB  
in bone marrow-derived cells

Chen Xi, Zhao Xiaoqing, Zhang Ke

(Teaching and Research Section of Developmental Cell Biology, College of Life Sciences,  
China Medical University)

**【Abstract】Objective:** To identify the expression of RNA hsa\_circ\_0066336(circFLNB) in bone marrow-derived cells, and to analyze its potential function. **Methods:** Bone marrow-derived cells THP-1 and Jurket were selected as model cells. Divergent primers were designed, and differences of circRNA expression in two model cells were analyzed. T-A cloning was used to construct plasmids for comparing. Then Arraystar software was used to predict the target miRNA of hsa\_circ\_0066336. The target miRNA was extracted and reverse transcribed from THP-1, and then was detected by Real-time PCR. **Results:** ①CircFLNB was successfully amplified in THP-1 and Jurket cells, and statistical analysis showed that their expression was not significantly different in two model cells ( $P=0.105$ ). ②The plasmid containing hsa\_circ\_0066336 was cloned, and a back-splice junction was found after comparing two sequences. ③Five target miRNAs of hsa\_circ\_0066336 were predicted by Arraystar software and corresponding expressions were detected. **Conclusion:** CircFLNB is a circular RNA expressed in bone marrow derived cells and it is suggested that circFLNB may involve in the development of various diseases by comprehending its downstream miRNA function.

**【Key words】** circular RNA; hsa\_circ\_0066336; bone marrow derived cell; microRNA

最近研究表明,环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)是一种新的内源性非编码 RNA,在哺乳动

物中大量存在,并且有调节哺乳动物基因表达的作用。环状 RNA 与线性 RNA 的不同点在于,环状 RNA 的特征性结构是共价闭环结构,没有线性 RNA 的 5' 端帽子结构和 3' 端聚腺苷酸尾部结构,也不存在线性 RNA 5' 端和 3' 端的极性<sup>[1-2]</sup>。人们曾以为环状 RNA 转录本的表达量极少。最近的 2 项独立研究表明,在人体和小鼠体内都可以检测到大

作者介绍:陈 希,Email:13322473792@163.com,

研究方向:阿尔茨海默病的发病机制。

通信作者:张 可,Email:kzhang@cmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81571046)。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200610.1707.052.html

(2020-06-11)

量环状 RNA 的存在<sup>[3-4]</sup>。在哺乳动物细胞中,大量表达的内源性环状 RNA 具有高度保守性和稳定表达的特性,同时发现环状 RNA 可能在某些特定类型细胞中或特定发育阶段中特异性表达<sup>[3-4]</sup>。这些发现均表明,环状 RNA 或许在许多生理和病理过程中发挥重要作用。内源性环状 RNA 因其闭环结构,天然具有抵抗核酸外切酶降解的能力,同时它也有选择性地含有保守 microRNA(miRNA)的结合靶位。已有研究表明,在哺乳动物细胞中,环状 RNA 起 miRNA“海绵”作用,并且能够与 miRNA 相互作用,从而调控靶基因的表达<sup>[1-4]</sup>。

本研究团队在前期研究中,利用 circRNA 芯片技术从阿尔茨海默病患者外周血中筛选到表达异常的 circRNA(数据未显示)。在对这些 circRNA 进一步分析时,发现来自转录本 Filamin B(FLNB)的环状 RNA、hsa\_circ\_0066336(circFLNB)在阿尔茨海默病患者外周血中表达下调至同年龄对照组的 22%左右。CircFLNB 定位在染色体 chr3:58104598–58112489 上,是一种外显子类型的 circRNA。目前尚未有关于 circFLNB 的相关报道,鉴于其在外周血中的表达显著下调,本研究选取 circFLNB 为研究对象,在骨髓源性细胞中对其进行鉴定,并对其功能作进一步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞 THP-1 细胞(人急性单核细胞白血病细胞)和 Jurket 细胞(人急性 T 细胞白血病细胞)购于 ATCC 公司。

1.1.2 实验试剂 RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司;TRIzol 试剂、质粒小量 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 AXYGEN 公司;引物序列、总 RNA 抽提试剂盒购于生工有限公司;琼脂糖购自 SABC 公司;Takara Ex Taq DNA 凝胶 Polymerase、pMDTM19-T Vector Cloning Kit、SYBR Premix Ex Taq II 购自大连 Takara 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 THP-1 细胞是呈悬浮状态生长的单核细胞,其培养基由 RPMI1640 外加 10%胎牛血清(fetal calf serum,FBS)组成。THP-1 细胞在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%饱和湿度的细胞培养箱中生长良好、稳定。当培养瓶中的细胞数达  $8 \times 10^6$  个/mL 时,将培养瓶中细胞全部移入 15 mL 离心管中,离心收集细胞,弃掉废弃的培养液,用 THP-1 细胞培养液重

悬细胞,以 1:3 的比例传代培养,一般 2~3 d 传代 1 次。Jurket 细胞按照与 THP-1 相同的培养方式进行培养与传代。

1.2.2 目的 circRNA 的克隆 分别培养 THP-1 细胞和 Jurket 细胞,待细胞生长到密度约为  $8 \times 10^6$  个/mL 时,离心收集细胞,以 1 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)重悬细胞至 1.5 mL 小型离心管(eppendorf,EP)中,以 TRIzol 法收取细胞中 RNA 后,对 RNA 定量后进行反转录合成 cDNA。以获得的 THP-1 和 Jurket cDNA 为模板,进行 PCR 反应。针对 hsa\_circ\_0066336 设计引物(表 1),用 1%琼脂糖电泳分离扩增的 PCR 产物。再对 PCR 产物切胶回收,进行 T-A 克隆。对 circRNA 的 RT-PCR 半定量分析,选取 GAPDH 作为内参基因。对 RT-PCR 产物用 Image J 软件进行定量分析统计。

1.2.3 构建含有 hsa\_circ\_0066336 质粒 T-A 克隆后,挑取 X-Gal 琼脂平板中单个白色圆形菌落,提取质粒。酶切鉴定后,将构建好的质粒送到生工生物工程股份有限公司进行基因测序。将测序结果在 NCBI 进行比对,在 NCBI 主页打开 BLAST 页面,在页面中选择 Align two sequences using BLAST,分别在相应的文本框中输入测序结果和 circRNA 的反向剪切后环化位点进行对比。

1.2.4 CircFLNB 靶向 miRNA 的预测 应用 Arraystar 自主研发的以 miRanda 和 TargetScan 为基础的软件进行测算,预测潜在的与 circFLNB 相互作用的 miRNA 靶标。

1.2.5 Hsa\_circ\_0066336 靶向 miRNA 的检测 用总 RNA 抽提试剂盒提取 THP-1 中总 RNA 后,因为 miRNA 长度较短,很难对其直接定量,所以采用茎环引物法设计靶向 miRNA 逆转录引物和 PCR 引物,同时设计内参引物 U6 的逆转录引物和 PCR 引物(表 1),反转录过程中,茎环逆转录引物与 miRNA 先结合,而后进行 Real-time PCR,茎环结构被打开,引物的一条与茎环公共序列相结合,另一条与靶向 miRNA 序列结合。反转录条件和 Real-time PCR 反应条件按照 Takara 试剂盒说明书进行。最后通过 Real-time PCR 实验,可以得到 hsa\_circ\_0066336 靶向 miRNA 的扩增曲线与溶解曲线。

### 1.3 统计学处理

定量分析结果采用 Excel 分析数据库进行处理。数值以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。样本均数比较用单因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CircFLNB 在骨髓源性细胞 THP-1 和 Jurket 中的表达和鉴定

环状 RNA 与线性 RNA 的不同点在于,环状 RNA 的特征性结构是共价闭环结构,因此针对 circFLNB 反向剪切后环化位点设计背对背引物(divergent primers)(图 1A),并在

THP-1 和 Jurket 细胞中通过 RT-PCR 技术获得 circFLNB(图 1B)。通过 Image J 定量分析,当  $n=5$  时,以 circFLNB/GAPDH 的比值为纵坐标做柱状图(图 1C),后经方差分析, circFLNB 在 THP-1 和 Jurket 中的表达量分别为 GAPDH 组的  $(83.2 \pm 9.9)\%$  和  $(72.0 \pm 9.5)\%$ , 得出 circFLNB 的表达在 THP-1 和 Jurket 细胞中没有统计学差异( $F=3.33, P=0.105$ )。

将扩增的 circFLNB 克隆到质粒中,并用限制性内切酶酶切鉴定。结果显示,在 THP-1 细胞和 Jurket 细胞中均检测到 circFLNB 的表达(图 2A)。将 DNA 测序结果置于 circBase 中进行分析,比对结果显示测序获得的序列与 circBase 中的剪接点完全一致。这表明 circFLNB 是以环状结构的形态而自然存在于骨髓源性的细胞内(图 2B)。

## 2.2 CircFLNB 靶向 miRNA 的预测和分析

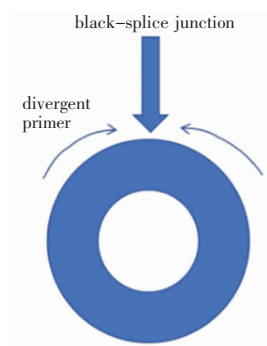
理论上讲,种子匹配的保守序列可以用来预测 circRNA 及其 miRNA 靶标之间的相互作用,同时通过其靶标 miRNA 也可以预测 circRNA 的功能。本研究使用基于 TargetScan<sup>[5]</sup>和 miRanda<sup>[6]</sup>原理开发的软件 Arraystar 来预测 circFLNB 靶向的 miRNA,并罗列出排名最高的 5 个(Top-5)潜在 miRNA。如图 3 所示, circFLNB 和其 Top-5 的 miRNA 靶标是通过它们之间特定的碱基配对方式而产生相互作用的。

## 2.3 Hsa\_circ\_0066336 靶向 miRNA 的表达

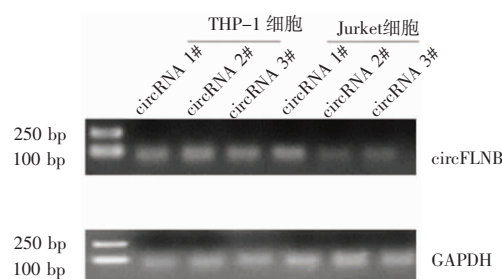
MicroRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,在动植物中参与转录后基因表达调控。本研究筛选出 hsa\_circ\_0066336 靶向的

表 1 PCR 引物序列列表

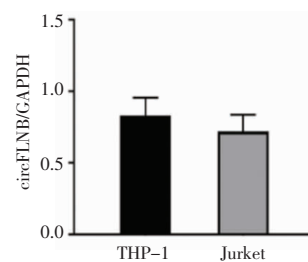
| 名称               | 序列名称       | 序列                                                        |
|------------------|------------|-----------------------------------------------------------|
| hsa_circ_0066336 | sense      | 5'_GGCAGCTGCAGTGTGAGTA_3'                                 |
|                  | anti-sense | 5'_GGATCGCCACCGTAAGTCA_3'                                 |
| hsa-miR-433-5p   | 逆转录引物      | 5'_GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACGAATAAT_3' |
|                  | sense      | 5'_CGGGCTACGGTACGCTGT_3'                                  |
| hsa-miR-769-3p   | 逆转录引物      | 5'_GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACAACCAAG_3' |
|                  | sense      | 5'_CGGGCTCGGGATCTCCG_3'                                   |
| hsa-miR-370-5p   | 逆转录引物      | 5'_GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACGTAAGT_3'  |
|                  | sense      | 5'_CGGGCTCGGGATCTCCG_3'                                   |
| hsa-miR-638      | 逆转录引物      | 5'_GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACAGGCCGC_3' |
|                  | sense      | 5'_CGGGCAGGATCGCGGGCGGGT_3'                               |
| hsa-miR-660-3p   | 逆转录引物      | 5'_GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACTAATCCA_3' |
|                  | sense      | 5'_CGGGCACCTCCTGTGTGCAT_3'                                |
| U6               | 逆转录引物      | 5'_CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT_3'                            |
|                  | sense      | 5'_GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT_3'                           |
|                  | anti-sense | 5'_CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT_3'                            |



A. 背对背引物的设计



B. circFLNB 在模式细胞中的扩增



C. circFLNB 差异性表达

图 1 circFLNB 在模式细胞中的表达水平

Top-5 miRNA, 并通过 Real-time PCR 技术检测到 hsa-miR-433-5p、hsa-miR-769-3p、hsa-miR-370-5p、hsa-miR-638 的表达。它们的 CT 值分别为 25.86、14.732、25.736、27.828。本

研究通过溶解曲线的单一峰值确定了这种扩增的特异性, 但是同样的方式并没有检测到 hsa-miR-660-3p 的表达 (图 4)。

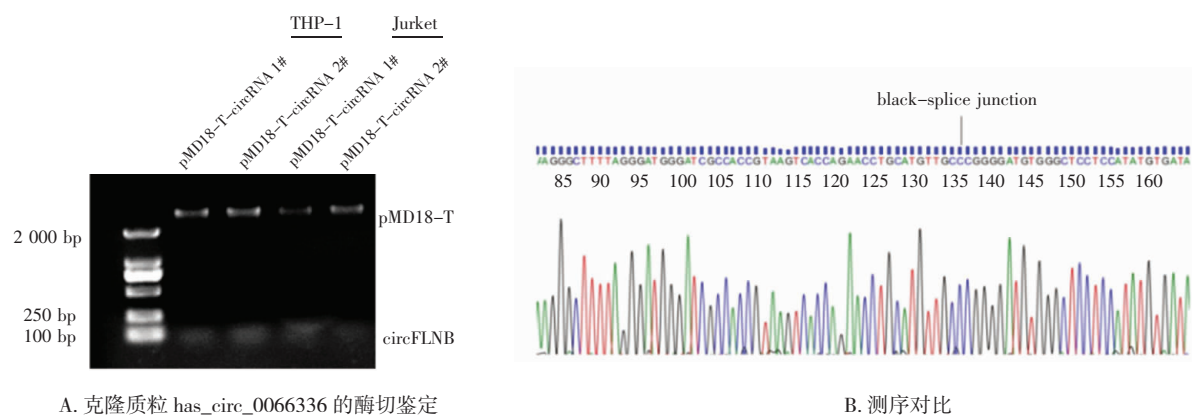


图 2 circFLNB 质粒的构建

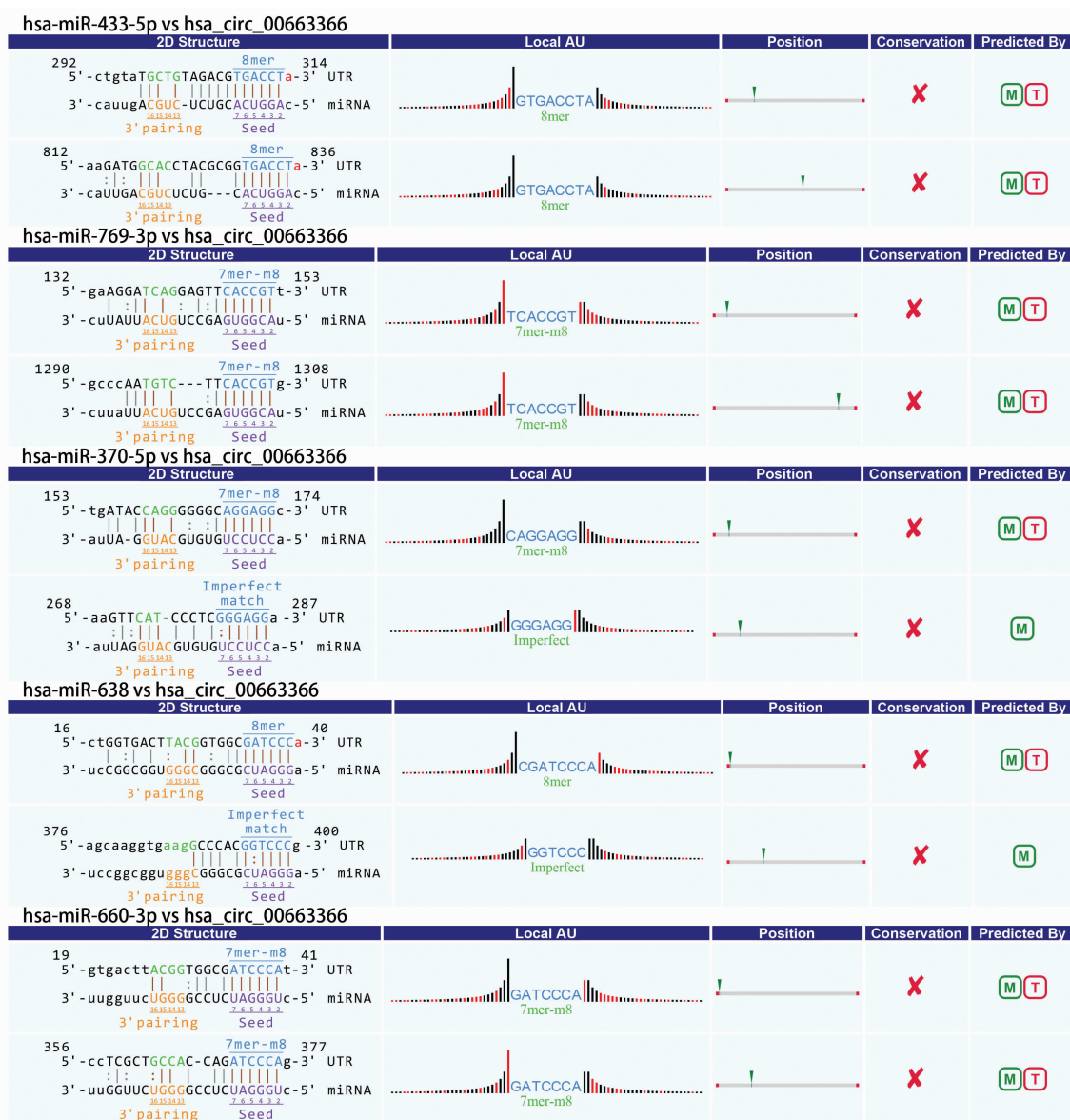


图 3 Arraystar 预测 has\_circ\_0066336 靶向的 5 个排名最高的 miRNA

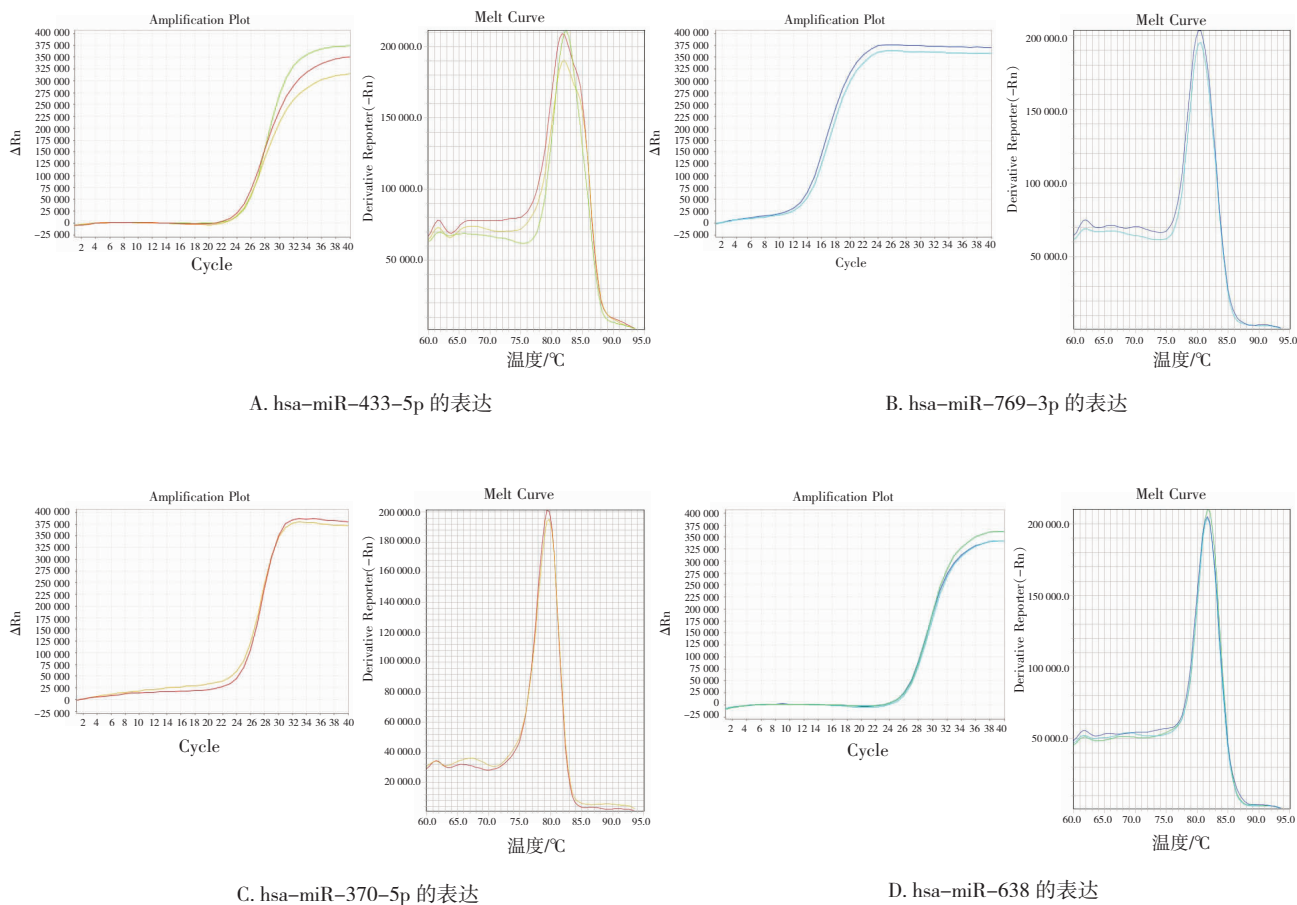


图 4 Real-time PCR 检测 hsa\_circ\_0066336 的靶向 miRNA 的表达

### 3 讨论

外周血中的 circRNA 可作为潜在的生物标志物,帮助诊断许多疾病。例如,外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)中的 hsa\_circ\_0001275 可诊断绝经后骨质疏松症<sup>[7]</sup>。和正常人对,重度抑郁症(major depressive disorder,MDD)患者中的 hsa\_circRNA\_103636 表达下调,经过抗抑郁方案治疗 8 周后,其表达量明显改变<sup>[8]</sup>。这表明 hsa\_circRNA\_103636 是诊断和治疗 MDD 的新型潜在生物标志物。本研究团队在前期的工作中收集了阿尔茨海默病患者外周血,并进行了 circRNA 芯片分析,筛选出一系列表达差异的 circRNA。本研究选取 circFLNB 为研究对象,其原因是 circFLNB 的表达差异显著,并且目前在外周血生物标志物的研究

中尚未有相关报道。

由于 circRNA 在外周血中的表达量低,引物设计复杂,为了排除由于芯片结果引起的假阳性,首先需要在外周血细胞中对 hsa\_circRNA\_0066336 进行鉴定。本研究选取了外周血中能够代表单核细胞和淋巴细胞的 THP-1 细胞系和 Jurket 细胞系作为模式细胞,并针对 circRNA 的结构特点设计了 Divergent primers。CircRNA 以其共价闭环结构为特征,既没有 5' 端至 3' 端的极性,又没有聚腺苷酸尾巴。本研究分别从 THP-1 细胞和 Jurket 细胞系中检查到 hsa\_circ\_0066336 环状结构的自然存在。跨剪切位点的序列表明,hsa\_circ\_0066336 的闭环结构具有抵抗核酸外切酶降解的能力,可作为潜在生物标记物的基本特征。

尽管一些 circRNA 的存在已经被鉴定,但是 circRNA 的功能目前研究较少。CircRNA 作为

miRNA 海绵, 形成 circRNA-miRNA-mRNA 网络结构<sup>[9]</sup>, 是最常报告的发挥作用的模式。本研究利用生物信息学方法预测 hsa\_circ\_0066336 的靶向 miRNA, 列出了排名前 5 位的潜在 miRNA, 即 has-miR-433-5p、has-miR-769-3p、has-miR-370-5p、has-miR-638 和 has-miR-660-3p。在这 5 种靶向 miRNA 中检测到其中 4 种的表达。靶向 miRNA 在辅助疾病诊断方面有很重要的意义。相关研究表明, has-miR-433-5p 在恶性神经胶质瘤脑组织中的表达显著低于非肿瘤脑组织。同时, 在神经胶质瘤细胞系中 miR-433-5p 表达水平也明显降低<sup>[10]</sup>。MiR-433-5p 的靶基因 CLCN4 在胃癌旁黏膜组织中表达显著上调, 可以说明 miR-433-5p 通过靶向基因 CLCN4 起抑癌作用, 从而抑制细胞的活力、转移和侵袭<sup>[11]</sup>。miR-769-3p 也被验证在神经胶质瘤组织和神经胶质瘤细胞系中显著下调<sup>[12]</sup>。靶向的 miR-370-5p 被证明可以激活前列腺癌细胞中 p21 蛋白表达, 从而抑制前列腺癌细胞周期的进展和增殖<sup>[13]</sup>。靶向 miR-638 的下调能够促进人乳腺癌细胞(MDA-MB-231、MCF-7)的增殖、迁移和侵袭, 表明 miR-638 是乳腺癌的抑癌基因, 参与乳腺癌的发展, 因此被作为乳腺癌的预后生物标志物<sup>[14]</sup>。通过确定 200 例非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)患者化疗前后的血清 miR-638 水平, 分析其临床病理特征与化疗后 miR-638 表达模式关系, 结果表明血清 miR-638 水平与 NSCLC 患者的生存有关, 被认为是 NSCLC 预后的潜在独立预测指标<sup>[15]</sup>。通过对这些靶向 miRNA 的功能分析, 推测 circFLNB 可能会参与多种疾病的发生发展。

综上所述, circFLNB 是表达在血细胞中的一个环状 RNA。通过对其下游靶向 miRNA 的功能分析, 推测 circFLNB 是一个可能参与多种疾病发生的潜在上游分子。本研究团队将在后续的研究中, 进一步探讨 circFLNB 是否是调控这些 miRNA 作用的关键上游分子, 并且尝试鉴定其在各种疾病模型中的参与作用。

## 参 考 文 献

- [1] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, challenges of circular RNAs[J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3):428-442.
- [2] Filippenkov IB, Kalinichevko EO, Limborska SA, et al. Circular RNAs—one of the enigmas of the brain[J]. *Neurogenetics*, 2017, 18(1):1-6.
- [3] Okholm TLH, Nielsen MM, Hamilton MP, et al. Circular RNA expression is abundant and correlated to aggressiveness in early-stage bladder cancer[J]. *NPJ Genom Med*, 2017, 2:36.
- [4] Wilusz JE. A 360° view of circular RNAs: from biogenesis to functions[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, 9(4):e1478.
- [5] Agarwal V, Subtelny AO, Thiru P, et al. Predicting microRNA targeting efficacy in *Drosophila*[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1):152.
- [6] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4):271-282.
- [7] Zhao KW, Zhao Q, Guo ZD, et al. Hsa\_circ\_0001275: a potential novel diagnostic biomarker for postmenopausal osteoporosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6):2508-2516.
- [8] Cui XL, Niu W, Kong LM, et al. Hsa\_circRNA\_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in major depressive disorder[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(9):943-952.
- [9] Han D, Li JX, Wang HM, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. *Hepatology*, 2017, 66(4):1151-1164.
- [10] Sun SP, Wang XY, Xu XN, et al. MiR-433-3p suppresses cell growth and enhances chemosensitivity by targeting CREB in human glioma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3):5057-5068.
- [11] Wang W, Pan J, Jiang HB. Roles of miR-433-5p in gastric carcinoma cell viability, invasion, and apoptosis via targeting CLCN4 genes[J]. *Original Article*, 2019, 12(8):9688-9698.
- [12] Wang K, Yang SS, Gao YS, et al. MicroRNA-769-3p inhibits tumor progression in glioma by suppressing ZEB2 and inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1):992-1000.
- [13] Li CC, Ge QQ, Liu JX, et al. Effect of miR-1236-3p and miR-370-5p on activation of p21 in various tumors and its inhibition on the growth of lung cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6):1010428317710824.
- [14] Li MH, Wang J, Liu HB. Downregulation of miR-638 promotes progression of breast cancer and is associated with prognosis of breast cancer patients[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:6871-6877.
- [15] Wang F, Lou JF, Cao Y, et al. MiR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy[J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(5):e162.

(责任编辑:唐秋姗)