

# 辐射前后甲状腺癌细胞 circRNA 的表达谱差异分析

张杰 李沥珂 吴振宇 贾恒哲 田延锋

河北医科大学第一医院乳腺甲状腺诊疗中心 河北石家庄 050031

**摘要：**目的：通过探讨辐射暴露前后甲状腺细胞系及甲状腺癌组织中 circRNA 表达谱的变化，旨在揭示 circRNA 在甲状腺癌发生发展中可能的作用机制。方法：本研究对辐射前后甲状腺癌细胞（TPC-1、BCPAP）及甲状腺滤泡上皮细胞（Nthy-ori-3-1）进行高通量测序，并与临床甲状腺癌样本对比。使用医用电子直线加速器提供 4 Gy 辐射处理样本，采用 Trizol 法提取总 RNA，经 Illumina 平台测序，并用 Bowtie2、TopHat2 进行数据比对和注释。筛选出的差异表达 circRNA 通过 miRNA 结合预测，并进行 GO 和 KEGG 富集分析，识别潜在靶基因及相关信号通路。结果：辐射处理后，甲状腺癌细胞和滤泡上皮细胞中大量 circRNA 差异表达。BCPAP 和 TPC-1 细胞株的差异 circRNA 分别为 9504 和 9751 个，临床样本中则较少。大部分 circRNA（90.81%）来源于编码区域，少部分来自基因间区域，其中 1 号和 2 号染色体上的数量最多，21 号最少。主要富集于 Wnt 和 PI3K-Akt 信号通路。结论：辐射影响下的 circRNA 可作为关键调控枢纽，通过 miRNA 的海绵机制调控关键生物过程和信号通路，为甲状腺癌分子机制研究及新治疗靶点开发奠定基础。

**关键词：**辐射；环状 RNA；甲状腺癌；高通量测序

近年来，甲状腺癌发病率快速上升<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示，甲状腺癌在中国发病率居第 9 位，女性显著高于男性<sup>[2]</sup>。随着高通量测序和生物技术发展，circRNA 在基因调控、蛋白翻译、表观遗传和肿瘤微环境中的作用逐渐被发现。辐射与甲状腺癌密切相关，辐射诱导的 circRNA 影响宿主生物过程并调控辐射效应，通过代谢调控影响辐射响应<sup>[3]</sup>。然而，circRNA 在辐射下的具体机制尚不明确。为探明其作用，我们采用高通量测序分析了辐射条件下甲状腺滤泡上皮细胞、甲状腺癌细胞及组织的 circRNA 表达谱，以明确发病机制，为临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本收集与处理

本研究经河北医科大学第一医院伦理委员会批准（批准号：20210373），收集了 2021 年 9 月至 2022 年 12 月在该院腺体疝外科接受甲状腺癌手术的患者组织样本及其临床资料。所有患者均签署书面知情同意书。手术标本在 30 分钟内浸入 RNA later™ 并存于 -20℃。纳入标准：（1）使用人甲状腺癌细胞 TPC-1（无 BRAFV600E 突变）、BCPAP（带 BRAFV600E 突变），及正常甲状腺滤泡上皮细胞 Nthy-ori-3-1。（2）临床样本需按规范保存于 RNA later™ 中。（3）所有患者需签署知情同意书并提供完整资料。排除标准：（1）

细胞系污染或状态不良。（2）样本保存超 30 分钟或处理不当。（3）患者未签署知情同意书或资料不完整。

### 1.2 细胞培养与辐射处理

本研究使用人甲状腺癌细胞 TPC-1（无 BRAFV600E 突变）、BCPAP（BRAFV600E 突变）及甲状腺滤泡上皮细胞 Nthy-ori-3-1，均在 RPMI-1640 培养基中培养，含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素，37℃、5% CO<sub>2</sub>。辐射处理采用医用电子直线加速器，6 MeV 电子束，剂量 4 Gy。

### 1.3 RNA 提取与质量评估

使用 Trizol 试剂提取组织及细胞样本中的总 RNA。提取的 RNA 通过 NanoDrop 2000 光度计、琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 生物分析仪检测，以评估浓度、纯度和完整性，确保后续实验质量。

### 1.4 高通量测序与数据处理

采用 Illumina 平台对总 RNA 进行测序。使用 Ribo-Zero™ 试剂盒去除 rRNA，RNase R 消化线性 RNA 后，用随机六聚体引物合成第一链 cDNA。cDNA 文库经片段选择、末端修复、加 A 尾和接头连接后用 PCR 扩增。测序产生的原始图像文件通过 Base Calling 转换为原始读段（raw reads），随后进行质量控制，去除低质量读段和接头序列。

### 1.5 生物信息学分析

利用 Bowtie2 和 TopHat2 将高质量 clean reads 比对到参考基因组。使用 find-circ 鉴定和注释 circRNA。差异表达 circRNA 通过 DESeq2 分析，显著性阈值设为  $p < 0.05$ 。使用 GO 和 KEGG 数据库对差异 circRNA 的靶基因进行功能注释和富集分析。

### 1.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)

使用反转录 cDNA 为模板，设计特异性引物验证选定

circRNA。采用 SYBR Green 法定量分析目标 circRNA 的表达。每个样本进行三次技术重复以增强数据可靠性。

## 2 结果

### 2.1 CircRNA 测序质量分析

包含临床组织和细胞样本组的 12 个 RNA 数据。去除接头和低质量 Reads 后，Clean Reads 比例超 90%，基础错误率在 0.03% 以内。Q30 分析显示，大多数样本 Q30 值超 91%，表明错误率  $< 0.1\%$  的碱基比例超 91%。详见表 1。

表 1 CircRNA 高通量测序数据产出情况一览表

样本	文库	原始碱基数	清洗后的碱基数	错误率	质量值 Q20	质量值 Q30	GC 含量百分比
B0	FRCL22H003361-1a	9.06G	8.83G	0.03	96.89	92.21	58.56
N0	FRCL22H003362-1a	9.07G	8.9G	0.03	97.09	92.78	56.93
T0	FRCL22H003363-1a	8.7G	8.48G	0.03	97.28	93.04	57.16
B4	FRCL22H003364-1a	8.89G	8.61G	0.03	97.15	92.87	58.42
N4	FRCL22H003365-1a	8.18G	8.0G	0.03	97.23	92.99	59.93
T4	FRCL22H003366-1a	8.81G	8.51G	0.03	97.02	92.71	58.26
RT_1	FRCL220249270-1a	9.55G	9.2G	0.03	96.53	91.91	58.28
RT_2	FRCL220249271-1a	9.36G	8.96G	0.03	96.17	91.47	58.59
RT_3	FRCL220249272-1a	10.78G	10.38G	0.03	96.45	91.8	58.06
nonRT_3	FRCL220249273-1a	9.08G	8.73G	0.03	96.24	91.45	58.91
nonRT_1	FRCL220249274-1a	9.21G	8.89G	0.03	96.55	92	55.98
nonRT_2	FRCL220249275-1a	9.27G	8.96G	0.03	96.44	91.67	57.2

### 2.2 circRNA 鉴定与表达谱分析

通过高通量测序，在辐射前后的甲状腺癌和滤泡上皮细胞中鉴定出 41,679 个 circRNA。90.81% 的 circRNA 来源于编码区域，少数来自基因间区域（图 1）。所有染色体均有转录，1 号和 2 号染色体最多，21 号最少（图 2）。长度范围 77-9124nt，300-500nt 最常见（图 3）。

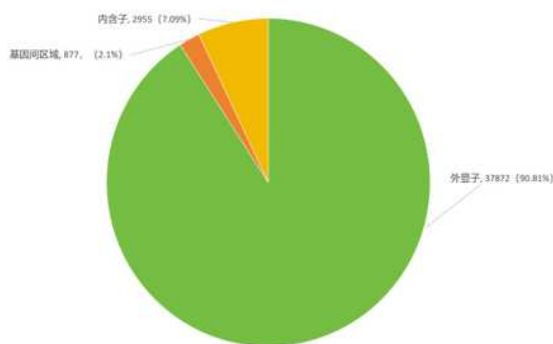


图 1 circRNA 基因组序列来源

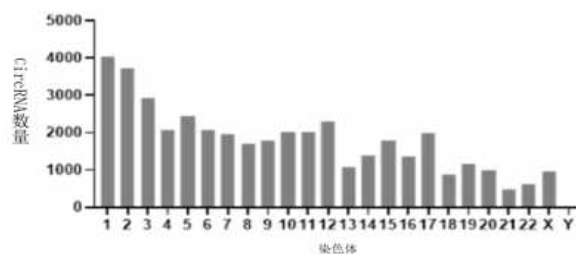


图 2 circRNA 的染色体数量密度分布

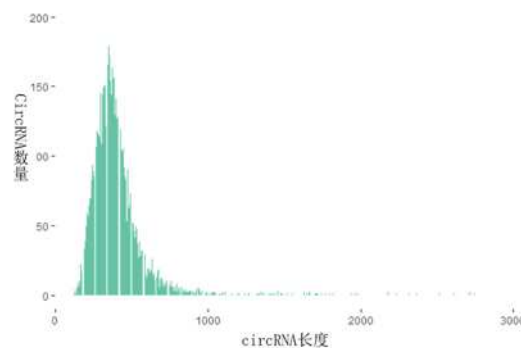


图 3 CircRNA 长度分布图

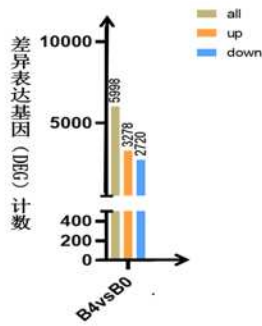


图4 差异表达 CircRNA 柱状图

### 2.3 差异表达的 circRNA 分析

辐射处理后，甲状腺癌和滤泡上皮细胞中出现大量差异性表达的 circRNA。BCPAP 和 TPC-1 细胞株的差异 circRNA 总数分别为 9504 和 9751 个，临床样本中仅 260 个（图 4）。这些差异 circRNA 可能参与了细胞对辐射的响应。

### 2.4 CircRNA 靶向 miRNA 分析

为预测差异 circRNA 结合的 miRNA，选取甲状腺癌（PTC）中高表达的 271 条 miRNA，与 miRanda 预测的 circRNA 结合 miRNA 交集，筛选出 103 条 miRNA 用于后续靶基因分析（图 5）。为探索 103 个 miRNA 的功能及调控的 mRNA，使用五种软件（TargetScan、miRmap、miRanda、RNA22、PITA）进行靶基因预测（图 6）。综合预测结果，得到 1825 个共同靶基因。

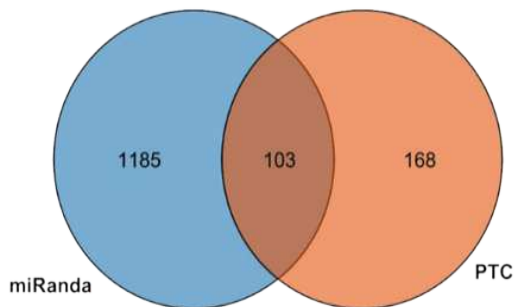


图5 差异表达 circRNA 结合的 miRNA 与 GEO 数据库样本中高表达 miRNA 的交集 Venn 图

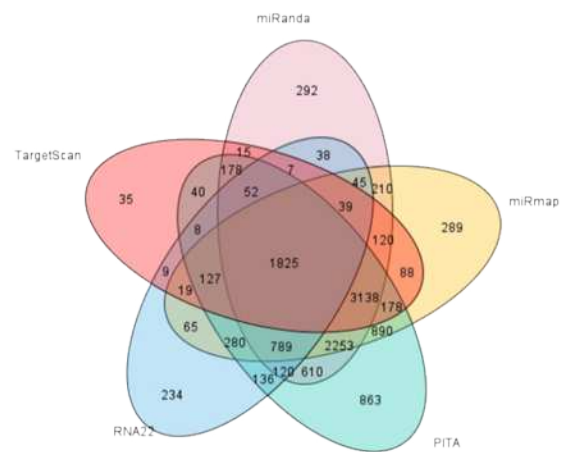


图6 靶基因预测结果 Venn 图

### 2.5 CircRNA 靶基因功能分析

对 103 个 miRNA 的靶基因进行 GO 和 KEGG 分析，结果显示靶基因主要富集于细胞周期、凋亡和增殖调控等生物过程。特别是，Wnt 和 PI3K-Akt 信号通路的显著富集突显了其在甲状腺癌细胞中的重要性（图 7A,B）。

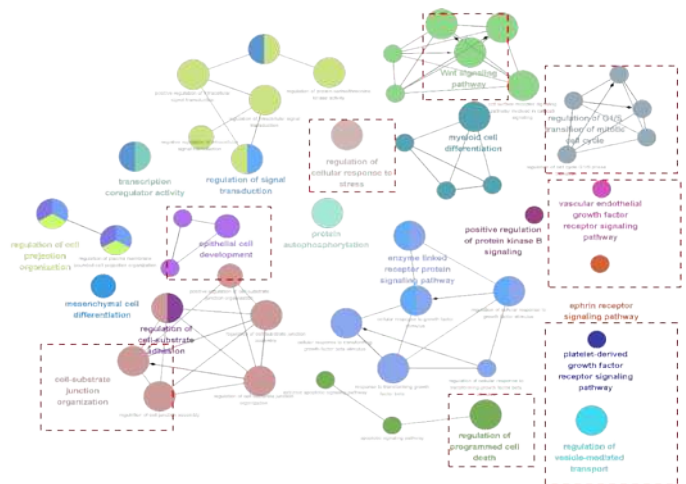


图7A circRNA 靶基因的 GO 生物学过程分析结果

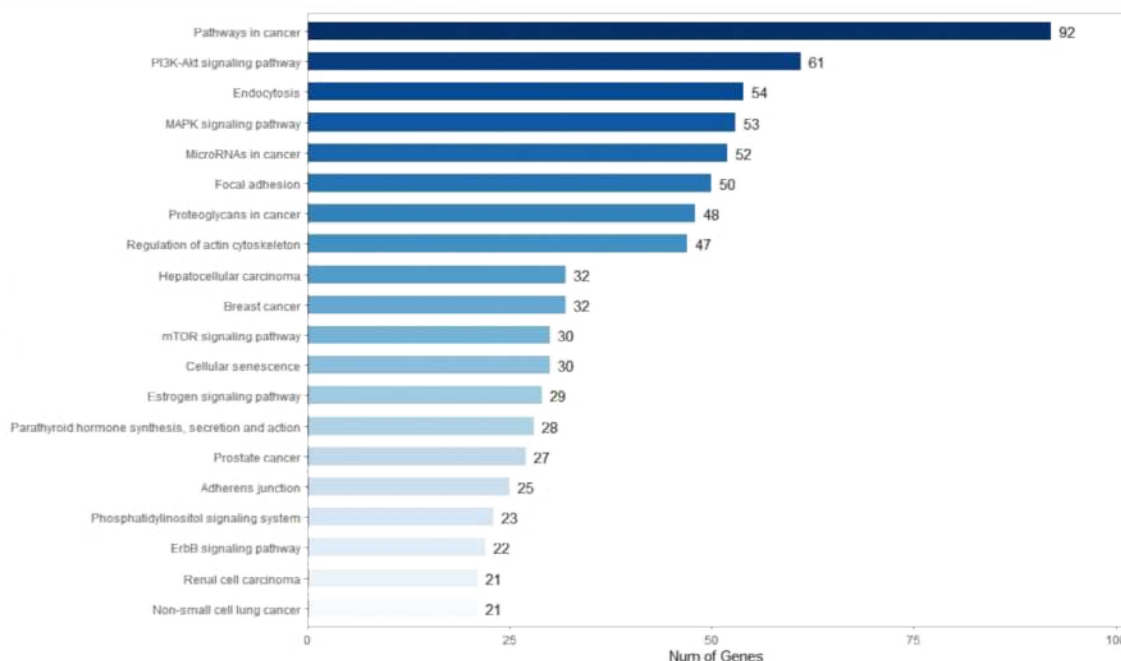


图 7B circRNA 靶基因的 KEGG 生物学过程分析结果

### 2.6 高丰度差异 circRNA 验证

通过荧光定量 PCR 验证差异 circRNA，结果显示辐射处理后，特定 circRNA（如 novel-0054871）在 BCPAP 细胞中显著上调，与高通量测序结果一致（图 8）。

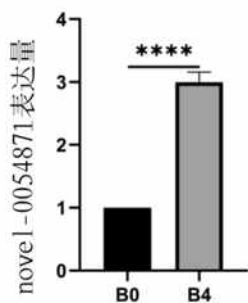


图 8 novel-0054871 RT-qPCR 验证

### 3 讨论

本研究分析了辐射前后甲状腺癌和滤泡上皮细胞中 circRNA 的表达谱，揭示了 circRNA 在辐射响应中的潜在调控作用。结果表明，辐射明显影响 circRNA 表达，尤其是在甲状腺癌细胞株 BCPAP 和 TPC-1 中。该发现对理解甲状腺癌细胞如何调整基因表达以适应辐射压力至关重要。

circRNA 作为 miRNA 的“海绵”通过竞争性结合 miRNA 抑制其活性，影响靶基因表达<sup>[4]</sup>。辐射诱导的 circRNA 变化可能通过影响 miRNA 的海绵作用调节多种生

物过程和信号通路。辐射可能干扰细胞周期及对肿瘤微环境的响应，特定 miRNA 如 miR-221-3p 和 miR-222-3p 可调节 SOCS3/STAT3 信号途径，降低甲状腺癌细胞的放射敏感性<sup>[5]</sup>。

GO 分析显示，辐射可能激活 DNA 修复、抗氧化响应及热休克蛋白表达等应激路径，有助于维持细胞存活，减少辐射引起的死亡<sup>[6]</sup>。miRNA-mRNA 关联分析揭示了这些 miRNA 在生物过程中的作用，特别是它们如何通过影响特定 mRNA 响应辐射对甲状腺癌的影响<sup>[7]</sup>。

GO 和 KEGG 分析显示，差异表达的 circRNA 显著富集于甲状腺癌特有的生物特性及辐射响应相关通路中，尤其是 PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路。近年来，MAPK 通路在肿瘤治疗中展现巨大潜力，如 BRAF、MEK 和 ERK 抑制剂在甲状腺癌中的应用<sup>[8]</sup>。这些通路在辐射应激反应、细胞稳态及增殖凋亡调控中起重要作用。最新研究表明，双重靶向 MAPK 和 PI3K 通路可促进 BRAF 突变甲状腺癌类器官再分化<sup>[9]</sup>。在辐射诱导反应中，细胞分化调控可能影响肿瘤细胞多样性及对辐射的反应。Li 等人<sup>[10]</sup>探索了大肠癌中放射敏感性、细胞死亡方式和 p53 状态与碳离子辐射 (CIR) 反应的关系。P53 野生型与突变型细胞中 siRNA p21 的表达差异及 CIR 对细胞的杀伤作用提示，肿瘤细胞可能通过诱导细胞衰老逃避辐射毒性，表明辐射可诱导细胞分化为更敏感或更抗辐射的状态，影响治疗效果。

circRNA 靶基因细胞组分分析表明, 辐射可能改变了细胞附着和迁移能力。其中, 细胞器边界膜和染色质的变化可能与辐射诱导的基因表达调控有关<sup>[1]</sup>。针对有无 BRAF 突变的两组甲状腺癌细胞系 BCPAP 与 TPC-1, 辐射前后 circRNAs 表现出差异性表达。后续研究有望探索 BRAF 突变与甲状腺癌辐射抗性间的联系。

本研究有助于理解辐射通过改变 circRNA 表达影响甲状腺癌的发生发展机制, 具体机制需进一步探索, 为未来甲状腺癌临床治疗提供更多可能性。

#### 参考文献:

- [1] 江沁. 甲状腺癌在中国及 G20 国家的流行趋势及疾病负担趋势研究 [D]. 中南大学, 2023. DOI:10.27661/d.cnki.gzhnu.2023.001136
- [2] 徐发展, 姜超喻, 伊丹丹, 等. 性别相关因素对甲状腺癌发生发展的影响 [J]. 东南大学学报 (医学版), 2023, 42(01): 154-159.
- [3] 喻程鹏, 宋嘉, 黄文杰. 环状 RNA 在肿瘤代谢中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2023, 48(04): 472-476. DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003210.
- [4] 钱傅燕雯, 冯凡, 许文林. ceRNA 在肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(07): 1237-1240.
- [5] Ye T, Zhong L, Ye X, Liu J, Li L, Yi H. miR-221-3p and miR-222-3p regulate the SOCS3/STAT3 signaling pathway to downregulate the expression of NIS and reduce radiosensitivity in thyroid cancer. *J. Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 652.
- [6] Rhee J S, Kim B M, Kim R O, Seo J S, Kim I C, Lee Y M, Lee J S. Co-expression of antioxidant enzymes with expression of p53, DNA repair, and heat shock protein genes in the gamma ray-irradiated hermaphroditic fish *Kryptolebias marmoratus* larvae. *J. Aquat Toxicol*, 2013, 140-141: 58-67.
- [7] 谢靖, 王旭. miRNA 与甲状腺癌发病的研究现状 [J]. 医学综述, 2019, 25(19): 3818-3822+3827.
- [8] 张芬, 余建琴, 张怀念. KRAS 基因沉默介导 MAPK1/ MAPK3 信号通路对乳头状甲状腺癌上皮间质转化的分子机制研究 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2020, 12(05): 473-479.
- [9] Schubert L, Mariko M L, Clerc J, Huillard O, Groussin L. MAPK Pathway Inhibitors in Thyroid Cancer: Preclinical and Clinical Data. *J. Cancers (Basel)*, 2023, 15(3).
- [10] Xu J, Patel N H, Saleh T, Cudjoe E K Jr, Alotaibi M, Wu Y, Lima S, Hawkridge A M, Gewirtz D A. Differential Radiation Sensitivity in p53 Wild-Type and p53-Deficient Tumor Cells Associated with Senescence but not Apoptosis or (Nonprotective) Autophagy. *J. Radiat Res*, 2018, 190(5): 538-557.
- [11] Somosy Z. Radiation response of cell organelles. *J. Micon*, 2000, 31(2): 165-181.

#### 作者简介:

田延锋 男 汉族 河北获鹿县人 (现石家庄鹿泉区) 研究生, 主任医师, 主要从事普外科临床及基础研究工作。

#### 基金项目:

河北省重点研发计划项目 (21372401D)。