

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002953

环状 RNA hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞瘤细胞活力和侵袭能力的影响及其作用机制

秦少杰, 宁明亮, 刘清媛, 唐振宁

(宁夏医科大学总医院肿瘤外三科, 银川 750004)

【摘要】目的:探讨环状 RNA hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞瘤细胞活力和侵袭能力的影响及其作用机制。**方法:**收集 2018 年 1 月至 2020 年 1 月在宁夏医科大学总医院接受根治性手术治疗的 20 对乳腺癌组织及癌旁, 通过 qRT-PCR 检测 hsa_circ_0002185 和 hsa-miR-1248 在人乳腺上皮细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3)中 mRNA 的表达水平。构建 T47D-siCirc(hsa_circ_0002185 沉默)和 T47D-NC(空载体对照)细胞株系, 并以 T47D 作为空白对照, qRT-PCR 检测 hsa_circ_0002185 mRNA 的表达水平; 分别采用 CCK-8 细胞活性实验、划痕实验和 Transwell 实验检测 hsa_circ_0002185 对 T47D 细胞的增殖、迁移和侵袭能力; 免疫荧光实验检测 E-cadherin 和 Vimentin 表达; 使用生物信息学网站 Circular RNA Interactome 预测 hsa_circ_0002185 可互补结合的 miRNA, 再根据 Targetscan 网站预测相应 miRNA 可靶向结合的基因; Western blot 检测 MAPK/ERK 信号通路蛋白和 E-cadherin 和 Vimentin 表达情况; 回复实验通过下调 hsa-miR-1248 验证 hsa_circ_0002185 对 T47D 细胞的影响。**结果:**hsa_circ_0002185 在 4 种人乳腺癌细胞的表达水平均比在人乳腺上皮细胞 MCF10A 中高, 并且在乳腺癌组织中的 mRNA 表达水平比在正常组织高; hsa-miR-1248 的表达水平呈相反情况; T47D-siCirc 细胞系相比空白对照细胞系和 T47D-NC 细胞系, 细胞的活性明显降低, 迁移能力和侵袭能力显著下降, E-cadherin 表达明显升高, Vimentin 明显下降 ($P < 0.05$); Circular RNA Interactome 网站预测结果显示, hsa_circ_0002185 可与 hsa-miR-1248 互补结合, Targetscan 网站预测分析显示, hsa-miR-1248 与 Raf1 存在靶向结合位点; Western blot 检测结果显示 T47D-siCirc 组中 hsa-miR-1248 表达明显高于空白对照组与 T47D-NC 组, Raf1、P-MEK1/2、MEK1/2、P-ERK1/2 和 ERK1/2 的表达明显低于空白对照组与 T47D-NC 组 ($P < 0.05$); 空白对照组和 T47D-NC 组中上述指标的表达量无统计学意义 ($P > 0.05$); 回复实验表明下调 hsa-miR-1248 可逆转 hsa_circ_0002185 沉默对 T47D 细胞的影响。**结论:**环状 RNA hsa_circ_0002185 在乳腺癌中高表达, 高表达 hsa_circ_0002185 可能通过调控 hsa-miR-1248 上调 Raf1 水平, 进而激活 MAPK/ERK 信号通路并促进上皮间质转化过程。

【关键词】环状 RNA hsa_circ_0002185; 侵袭能力; 乳腺癌; MAPK/ERK 信号通路; 上皮间质转化

【中图分类号】R237

【文献标志码】B

【收稿日期】2020-10-20

Effects of circular RNA hsa_circ_0002185 on cell viability and invasion of breast cancer cells and its mechanism of action

Qin Shaojie, Ning Mingliang, Liu Qingyuan, Tang Zhenning

(Oncological Surgery Third Department, General Hospital of Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of circular RNA hsa_circ_0002185 on cell viability and invasion of breast cancer cells and its mechanism of action. **Methods:** Totally 20 pairs of breast cancer tissues and adjacent tissues were collected from the patients who were treated by radical operation in General Hospital of Ningxia Medical University from January 2018 to January 2020, and the mRNA expression levels of hsa_circ_0002185 and hsa-miR-1248 in human mammary epithelial cells (MCF10A) and human breast cancer cells (MCF-7, T47D, BT-474 and SK-BR-3) were detected by qRT-PCR. The T47D siCirc (hsa_circ_0002185 silencing) and T47D-NC (empty vector control) cell lines were constructed by lentivirus infection. The expression of hsa_circ_0002185 mRNA was detected by qRT-PCR with T47D as blank control. CCK-8 cell viability test, scratch test and Transwell test were used to detect the proliferation, migration and invasion ability of hsa_circ_0002185 to T47D cells. Immunofluorescence assay was used to detect the ex-

pression of E-cadherin and Vimentin. Bioinformatics website Circular RNA Interactome was used to predict the complementary miRNA of hsa_circ_0002185, and then the corresponding miRNA targeted binding genes were predicted according to Targetscan website. The expression of MAPK/ERK signal protein and E-cadherin and Vimentin was detected by Western blot.

作者介绍: 秦少杰, Email: 156257088@qq.com, 研究方向: 甲状腺、乳腺肿瘤。

通信作者: 唐振宁, Email: tzhn-311@163.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (编号: 2019AAC03198), 宁夏医科大学校级重点项目 (编号: XZ20200020)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211221.0847.002.html> (2021-12-22)

The recovery experiment was carried out by down-regulation of hsa-miR-1248 to verify the effect of hsa_circ_0002185 on T47D cells. **Results:** The expression of hsa_circ_0002185 in four kinds of human breast cancer cells was higher than that in MCF10A cells, and the mRNA expression level in breast cancer tissues was higher than that in normal tissues. The expression level of hsa-miR-1248 was opposite. Compared with the blank control cell line and T47D-NC cell line, T47D-siCirc cell line significantly decreased cell viability, migration and invasion ability, increased E-cadherin expression and decreased Vimentin ($P < 0.05$). The results of Circular RNA Interactome website prediction showed that hsa_circ_0002185 could combine with hsa-miR-1248, and Targetscan website prediction analysis showed that hsa-miR-1248 and Raf1 had targeted binding sites. Western blot analysis showed that the expression of hsa-miR-1248 in T47D-siCirc group were significantly higher than that in blank control group and T47D-NC group, and Raf1, P-MEK1/2, MEK1/2, P-ERK1/2 and ERK1/2 in T47D-siCirc group were significantly lower than those in blank control group and T47D-NC group ($P < 0.05$). There was no significant difference in above indexes between the blank control group and T47D-NC group ($P > 0.05$). The reversion experiment showed that down-regulation of hsa-miR-1248 could reverse the effect of hsa_circ_0002185 silence on T47D cells. **Conclusion:** Circular RNA hsa_circ_0002185 is highly expressed in breast cancer. Overexpression of hsa_circ_0002185 may up-regulate Raf1 level by regulating hsa-miR-1248, thus activating MAPK/ERK signaling pathway and promoting the process of epithelial mesenchymal transition.

[Key words] circular RNA hsa_circ_0002185; invasion; breast cancer; MAPK/ERK signaling pathway; epithelial mesenchymal transition

乳腺癌是一种威胁全球女性身心健康的妇科恶性肿瘤,世界范围的乳腺癌发病率自 20 世纪 70 年代呈逐渐上升趋势^[1]。最新调查显示,乳腺癌发病率为 11.2%^[2]。随着医疗科技的不断发展,乳腺癌的治疗方法 and 效果都得到很大改善,患者的生存率得到明显提升,但是乳腺癌的病因机制并未完全清楚,而且近些年来患者逐渐呈现年轻化、低龄化趋势^[3]。有研究发现,乳腺癌的发生发展可能和环状 RNA(circRNA)的异常表达有关^[4]。circRNA 是一种环状闭合结构的非编码 RNA,无 5' 帽子和 3' 多聚腺苷酸尾,在生物体内广泛存在并发挥重要作用,通过在转录及转录后调控基因表达,从而对肿瘤的发生发展进行调控。因此,研究 circRNA 在乳腺癌中的分子机制对乳腺癌的靶向药物开发和临床诊断具有十分重要的意义。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 信号通路可以将胞外的各种刺激信号转导至胞内,从而引起细胞增殖、凋亡等诸多生物学反应^[5]。ERK 是一种细胞外调节蛋白激酶,是将胞外刺激信号从细胞表面受体传导至细胞核的关键。而 MAPK/ERK 信号通路就是 MAPK 的 4 大信号通路之一,也被认为是在哺乳动物中最为经典的 MAPK 信号通路^[6]。本文成功构建乳腺癌 hsa_circ_0002185 沉默细胞系,通过探究 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞的活性、迁移和侵袭能

力以及 MAPK/ERK 信号通路相关蛋白的表达水平,探究 hsa_circ_0002185 在乳腺癌中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 样本采集

收集 2018 年 1 月至 2020 年 1 月在宁夏医科大学总医院接受根治性手术治疗的 20 对乳腺癌组织及癌旁组织。20 例乳腺癌患者的年龄为 28~55 岁,所有患者在手术前均没有进行放化疗,所有样本的临床资料信息完整。样本纳入标准:①由 2 名病理科专家独自审核证实;②有病理确认的乳腺癌实验组及癌旁空白对照组;③手术前无放、化疗史。排除标准:①缺乏完整的临床信息;②仅有实验组,缺乏空白对照组;③肿瘤组织小,样本量不足。临床分期严格按照美国癌症协会(AJCC)制定的标准,其中 I 期 7 例、II 期 8 例、III 期 5 例。患者均自愿签署知情同意书,标本采集经本院伦理委员会批准通过。

1.2 主要试剂和仪器

人乳腺上皮细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞 MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3 购自美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)。由上海吉玛制药技术有限公司设计合成 siRNA。DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco, 美国), CCK-8 细胞活力检测试剂盒(日本同仁化学研究所), GBB16 型 CO₂ 培养箱(Heraeus, 德国), TRIzol 试剂盒(Takara, 日本), 全蛋白抽提试剂盒(QIAGEN, 德国), 倒置荧光显微镜(尼康, 日本), Transwell 小室(上海碧云天生物技术有限公司), 流式细胞仪(BD, 美国), 有用抗体(Abcam, 美国), siRNA 设计于广州锐博生物科技有限公司。

1.3 siRNA 的设计及细胞转染

siRNA 的设计及筛选: siRNA 由广州锐博生物科技有限公司设计合成。

hsa_circ_0002185 共设计 3 条 siRNA。siRNA1: Sense: GCAUCAUCCCAUUAUUAATT, Antisense: UUACGUAAUCG-AUUGAGCGTT; siRNA2: Sense: GGCCUAAGAGCCGGAUCU-ATT, Antisense: AAGCUCGGUCACUGGGUACTT; siRNA3: Sense: CCGCAGAACCGUGCUAAUUTT, Antisense: AAUAUG-CACGGUACUGUCGAT。通过 qRT-PCR 检测转染 circ-0002185 干扰片段后的 T47D 细胞中 hsa_circ_0002185 表达情况, 其中 siRNA1 的干扰效果最好, circ-0002185 的表达量最低, 后续实验均采用 siRNA1 进行研究。

hsa-miR-1248 共设计 2 条 siRNA。siRNA1: Sense: CAG-UACGUUCUCCAAUCGUTT, Antisense: UCGAUUCAGGCAGU-GAGUGTT; siRNA2: Sense: CGUAUUCGAGAAGAACCUUCT, Antisense: ACGUAGAUCUCUGCAUAGTT; 通过 qRT-PCR 检测转染 hsa-miR-1248 干扰片段后的 T47D-siCirc 细胞中 hsa-miR-1248 表达情况, 其中 siRNA2 的干扰效果最好, hsa-miR-1248 的表达量最低, 后续实验均采用 siRNA2 进行研究。

细胞培育: 人乳腺上皮细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞 (MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3) 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养箱温度为 37℃、5% CO₂, 2~3 d 更换 1 次培养基, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

siRNA 转染: 将乳腺癌 T47D 细胞株浓度调至 1×10^6 个/mL, 取 2 mL 置于 6 孔板中过夜培养, 采用 Lipofectamine 2000 将浓度均为 100 nmol/L 的 T47D-siCirc (hsa_circ_0002185 沉默) 和 T47D-NC (空载体空白对照组) 转染至乳腺癌 T47D 细胞, 所用载体是含有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因的真核表达载体 pWPXLd。转染后利用倒置荧光显微镜 (200×) 观察 GFP 的表达情况。空白对照组为没有进行转染的细胞。

收集对数生长期的 T47D-siCirc 细胞, 采用上述方法转染 T47D-simiR 及阴性对照 T47D-NC, 并分为 T47D-siCirc+simiR-1248 组和 T47D-siCirc+NC 组。

1.4 qRT-PCR 检测环状 RNA hsa_circ_0002185 和 hsa-miR-1248 的表达

通过 TRIzol 法提取各组样本的总 RNA。引物序列如下: hsa_circ_0002185: Forward: 5'-ATGTCGTCTGTGACCTCATG-GC-3', Reverse: 5'-AGCAGTGACTCCTAGCTGAA-3'; hsa-miR-1248: Forward: 5'-GCACAAGACCTGCAGGTACC-3', Reverse: 5'-TCTTCATTGATGTGCATCAG-3'; GAPDH: Forward: 5'-CAT-CACGATCTTCCACGAGCG-3', Reverse: 5'-TGACCCTGCCCA-CAGACTT-3'。反应条件: 75℃ 预变性, 2 min, 进入以下循环 90℃ 变性, 5 min; 60℃ 退火, 60 s; 72℃ 延伸, 30 s; 共 40 个循环。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。每组实验设置 3 次重复。

1.5 CCK-8 实验检测细胞活力

将 3 组细胞以 2 000 个/孔细胞密度置于 96 孔板中。每隔 24 h 更换 1 次培养基 (10% CCK-8 溶液)。分别取 5 个时间点 (0 h、24 h、48 h、72 h、96 h), 每个时间点设置 3 个重复, 使用酶标仪检测 492 nm 波长的光密度 (optical density, OD) 值。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

将 3 组细胞以 1×10^6 个/mL 浓度细胞悬液置于 6 孔板中, 过夜培养至单层贴壁细胞, 用 10 μ L 的枪头在单层细胞上划“—”字, PBS 清洗 3 次。在 0 h 和 24 h 后分别使用显微镜 (200×) 拍照, 测量划痕宽度并计算划痕愈合率, 划痕愈合率公式 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将 3 组细胞以 1×10^6 个/mL 浓度的细胞悬液加入 Transwell 上室中, 下室中加入含 20% 胎牛血清的培养基溶液。在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 然后对上室底部细胞用结晶紫进行染色, 用棉签擦去上室细胞, 最后显微镜拍照记录。结果统计, 显微镜 (400×) 下随机选取 5 个高倍镜视野进行细胞计数。

1.8 免疫荧光检测 E-cadherin 和 Vimentin 表达

将 3 组细胞以 1×10^6 个/mL 浓度的细胞悬液接种于载玻片上, 固定液 4℃ 孵育过夜, 抗体采用带绿色荧光标记的 E-cadherin 和红色荧光标记的 Vimentin 抗体进行检测 (1:1 000, Thermo Fisher Scientific, USA)。乙醇梯度洗脱后, 用 Alexa Fluor 594-偶联二抗 (1:5 000, Proteintech, USA) 室温孵育 1 h, DAPI 染色 5 min, 最后在激光共聚焦显微镜 (200×) 下进行观察。荧光强度采用的图像处理软件为 Image-Pro Plus 6.0。

1.9 生物信息学预测

采用生物信息学网站 Circular RNA Interactome 预测 hsa_circ_0002185 可互补结合的 miRNA, 采用 Targetscan 网站预测相应 miRNA 可靶向结合的基因。

1.10 Western blot 检测蛋白表达

首先收集各组细胞, PBS 清洗 3 次后, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行裂解提取总蛋白, 等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转至 PVDF 膜。然后用 5% BSA 进行封闭, 再依次孵育相应的一抗和二抗。最后进行显色并统计灰度值计算相对表达量。

1.11 统计学处理

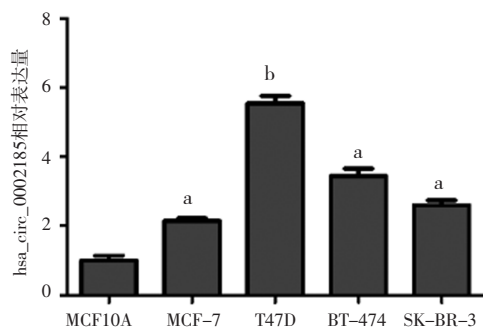
采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。采用 Graph-Pad 5.01 软件进行作图。2 组间比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 组织及细胞中 hsa_circ_0002185 的 mRNA 表达水平

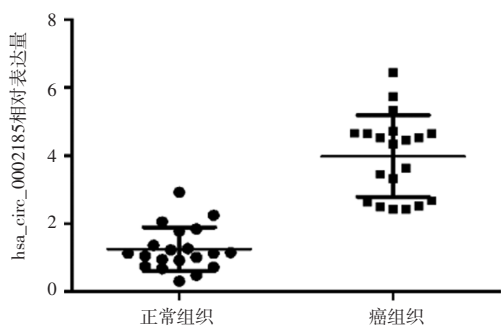
用 qRT-PCR 检测 hsa_circ_0002185 在人乳腺上皮细胞

MCF10A 和人乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3)中 mRNA 的表达水平。结果表明,hsa_circ_0002185 在人乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3)的 mRNA 表达水平均比在人乳腺上皮细胞 MCF10A 中高,且差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 1A),其中在 T47D 中的 mRNA 表达水平最高($P<0.01$,图 1A)。hsa_circ_0002185 在乳腺癌组织中的 mRNA 表达水平显著高于正常组织中的表达水平($P<0.05$,图 1B)。



注:a, $P<0.05$; b, $P<0.01$

A. hsa_circ_0002185 在人乳腺上皮细胞和 4 种人乳腺癌细胞中的 mRNA 表达水平

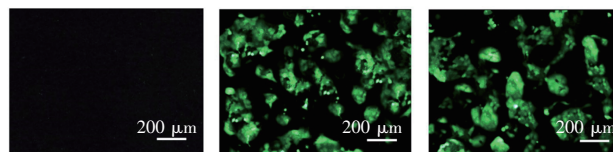


B. hsa_circ_0002185 在人正常组织和乳腺癌组织中的 mRNA 表达水平

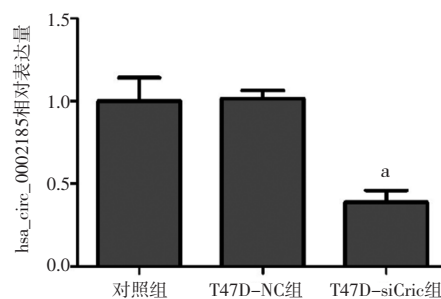
图 1 hsa_circ_0002185 和 hsa-miR-1248 在乳腺癌组织和不同细胞系中的 mRNA 表达水平

2.2 细胞系构建

hsa_circ_0002185 在 T47D 中的 mRNA 表达水平是 4 种乳腺癌细胞株中最高的,因此选择 T47D 细胞株作为后续研究。细胞转染后,通过倒置荧光显微镜检测发现,空白对照组无 GFP 绿色荧光,T47D-NC 组和 T47D-siCric 组有 GFP 绿色荧光(图 2A);同时 qRT-PCR 检测发现,空白对照组和 T47D-NC 组细胞中的 hsa_circ_0002185 mRNA 表达水平没有统计学差异($P>0.05$),T47D-siCric 组细胞中 hsa_circ_0002185 的 mRNA 表达水平明显低于空白对照组和 T47D-NC 组,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 2B),以上结果都证明成功构建了 T47D-NC 阴性对照和 T47D-siCric 沉默细胞系。



A. 转染成功的细胞在倒置荧光显微镜下的检测结果



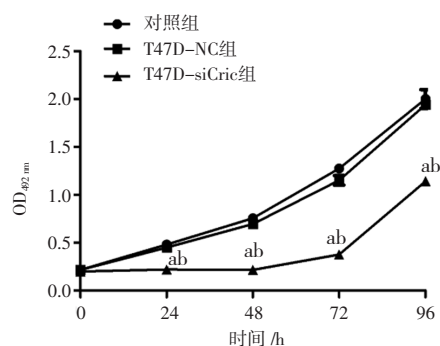
注:a,与空白对照组相比, $P<0.05$

B. hsa_circ_0002185 在 3 组细胞中的 mRNA 表达水平

图 2 T47D-NC 组和 T47D-siCric 组细胞系构建检测

2.3 hsa_circ_0002185 对细胞活力的影响

CCK-8 实验检测 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞活力的影响。结果显示,随着时间的推移,空白对照组和 T47D-NC 组的 OD 值没有统计学差异($P>0.05$),而 T47D-siCric 组细胞的 OD 值在各个时间点都显著低于空白对照组和 T47D-NC 组($P<0.05$,图 3),说明沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞的活力。

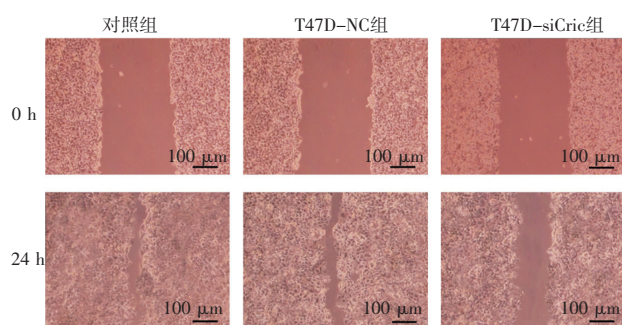


注:a,与空白对照组相比, $P<0.05$;b:与 T47D-NC 组相比, $P<0.05$

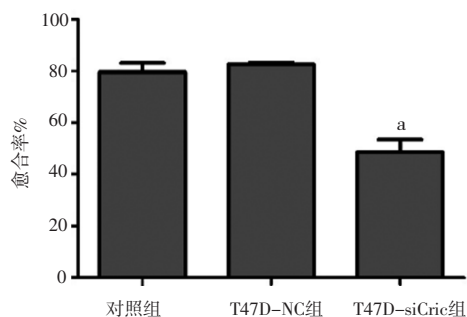
图 3 hsa_circ_0002185 对各组细胞活力的影响

2.4 hsa_circ_0002185 对细胞迁移能力的影响

通过划痕愈合实验检测 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞迁移能力的影响。结果显示,24 h 后,空白对照组和 T47D-NC 组的划痕间隙无明显差别,而 T47D-siCric 组的划痕间隙明显宽于空白对照组和 T47D-NC 组(图 4A)。通过划痕愈合率可以看出,空白对照组和 T47D-NC 组的愈合率无显著差异($P>0.05$),而 T47D-siCric 组的愈合率明显小于空白对照组和 T47D-NC 组($P<0.05$,图 4B)。以上结果说明,沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞的迁移能力。



A. 3 组细胞在倒置荧光显微镜下的检测结果

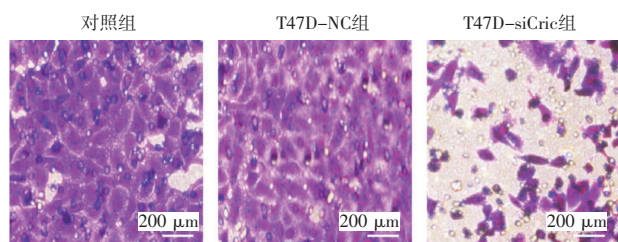
注:a,与对照组相比, $P<0.05$

B. 划痕愈合率

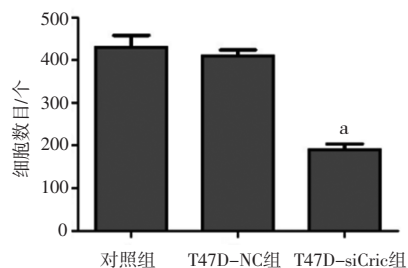
图4 hsa_circ_0002185 对各组细胞迁移能力的影响

2.5 hsa_circ_0002185 对细胞侵袭能力的影响

通过 Transwell 实验检测 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响。结果显示,24 h 后,空白对照组和 T47D-NC 组中穿过基底膜的细胞数目较多且无明显差别,而 T47D-siCric 组穿过基底膜的细胞数目明显少于空白对照组和 T47D-NC 组(图 5),结果说明沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞的侵袭能力。



A. 3 组细胞在倒置荧光显微镜下的检测结果

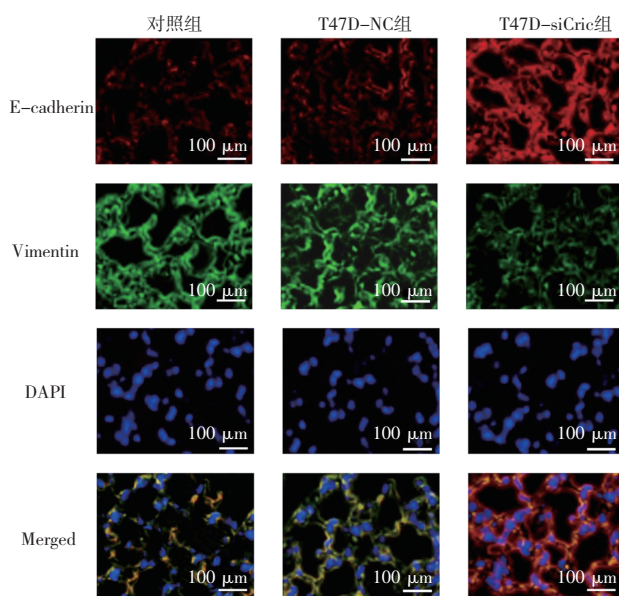
注:a,与对照组相比, $P<0.05$

B. 细胞侵袭能力

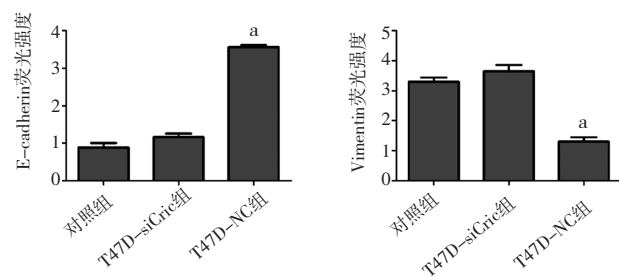
图5 hsa_circ_0002185 对各组细胞侵袭能力的影响

2.6 hsa_circ_0002185 对 EMT 相关分子表达的影响

E-cadherin 在免疫荧光中呈现红色,Vimentin 在免疫荧光中呈现绿色。结果显示,与空白对照组和 T47D-NC 组相比,T47D-siCric 组细胞中 E-cadherin 明显增多,Vimentin 明显降低,提示沉默 hsa_circ_0002185 后对细胞 EMT 过程产生影响(图 6)。



A. E-cadherin 和 Vimentin 的免疫荧光图

注:a,与对照组相比, $P<0.05$

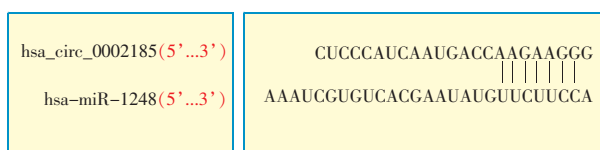
B. E-cadherin 和 Vimentin 的荧光强度

图6 免疫荧光结果

2.7 生物信息学预测及 hsa-miR-1248 mRNA 表达水平

采用 Circular RNA Interactome 网站预测结果显示,hsa_circ_0002185 可与 hsa-miR-1248 互补结合;采用 Targetscan 网站预测结果显示,hsa-miR-1248 与 RAF1 存在靶向结合位点(图 7A、B)。接着用 qRT-PCR 检测 hsa-miR-1248 在人乳腺上皮细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3)中 mRNA 的表达水平,结果显示 hsa-miR-1248 在人乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、BT-474 和 SK-BR-3)的 mRNA 表达水平均比在人乳腺上皮细胞 MCF10A 中低,且差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 7C),其中在 T47D 中的 mRNA 表达水平最低($P<0.01$,图 7C)。另外 hsa-miR-1248 在乳腺组织中的 mRNA 表达水平显著低于在正常组织中的表达水

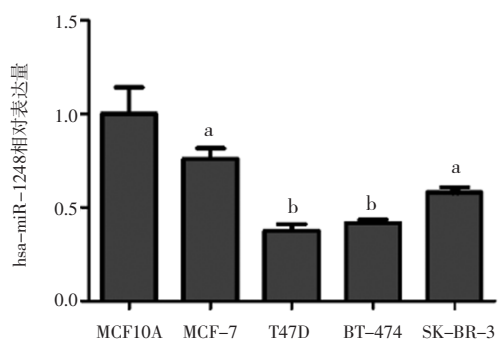
平($P<0.05$,图 7D)。结合 2.1 中的结果,表明在乳腺癌组织和细胞中 hsa_circ_0002185 和 hsa-miR-1248 mRNA 表达情况呈相反情况。



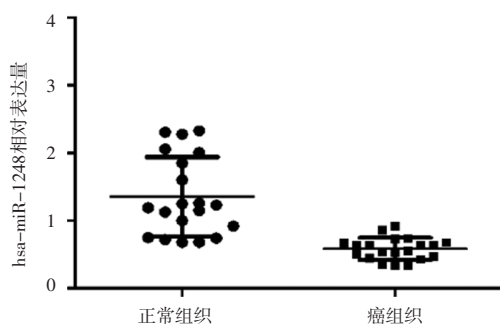
A. Circular RNA Interactome 网站预测结果

	Predicted consequential pairing of target region(top) and miRNA (bottom)
Position 185-191 of RAF1 3'UTR	5' ...CCUUGGGCCUGGAGAAGAA...
hsa-miR-1248	3' AAAUCGUGUCACGAAUAUGUUCUCCA

B. Targetscan 网站预测结果



C. hsa-miR-1248 在人乳腺癌上皮细胞和 4 种人乳腺癌细胞中 mRNA 的表达水平



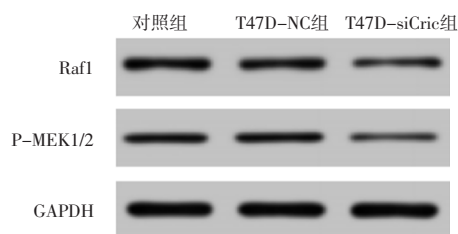
注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与对照组相比, $P<0.01$

D. hsa-miR-1248 在人正常组织和乳腺癌组织中 mRNA 的表达水平

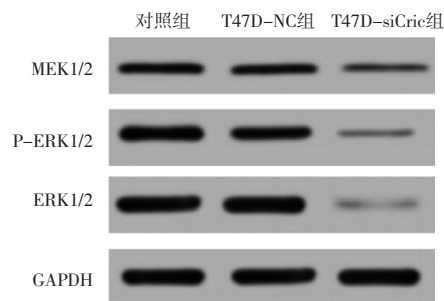
图 7 生物信息学靶向预测结果

2.8 hsa_circ_0002185 对 MAPK 通路相关蛋白表达的影响

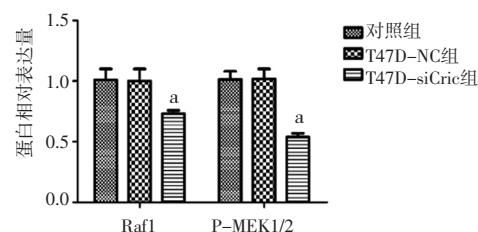
Western blot 检测结果显示,空白对照组和 T47D-NC 组细胞中 Raf1、P-MEK1/2、MEK1/2、P-ERK1/2 和 ERK1/2 的蛋白表达无统计学差别;T47D-siCric 组 Raf1、P-MEK1/2、MEK1/2、P-ERK1/2 和 ERK1/2 在 T47D-siCric 组细胞中的蛋白表达量明显低于空白对照组和 T47D-NC 组($P<0.05$,图 8),结果说明沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞中 Raf1、P-MEK1/2、MEK1/2、P-ERK1/2 和 ERK1/2 的蛋白表达量。



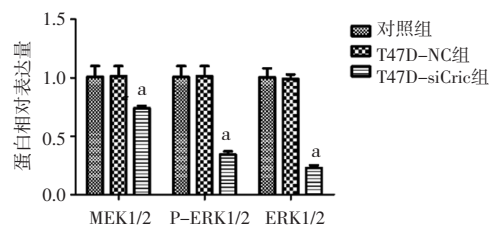
A. 蛋白印记结果图



B. 蛋白印记结果图



C. 蛋白相对表达量



D. 蛋白相对表达量

注:a,与空白对照组相比, $P<0.05$

图 8 蛋白印记检测蛋白表达

2.9 下调 hsa-miR-1248 验证 hsa_circ_0002185 对 T47D 细胞的影响

T47D 细胞沉默 hsa_circ_0002185 后,再下调 hsa-miR-1248 观察乳腺癌细胞增殖和侵袭能力,并检测对 EMT 相关分子和 MAPK 通路相关基因的蛋白表达水平影响。T47D-siCirc+simiR-1248 组中 hsa-miR-1248 相对表达量明显低于 T47D-siCirc+NC 组($P<0.05$),提示沉默细胞系构建成功;CCK-8 实验和 Transwell 实验显示,T47D-siCirc+simiR-1248 组细胞活力增强,细胞侵袭能力增强(均 $P<0.05$);通过 Western blot 检测发现,T47D-siCirc+simiR-1248 组细胞的 E-cadherin 表达水平降低、Vimentin 表达水平升高,Raf1、MEK1/2、ERK1/2 表达水平均升高。上述均说明下调 hsa-miR-1248 可逆转 hsa_circ_0002185 沉默对 T47D 细胞的影响(图 9)。

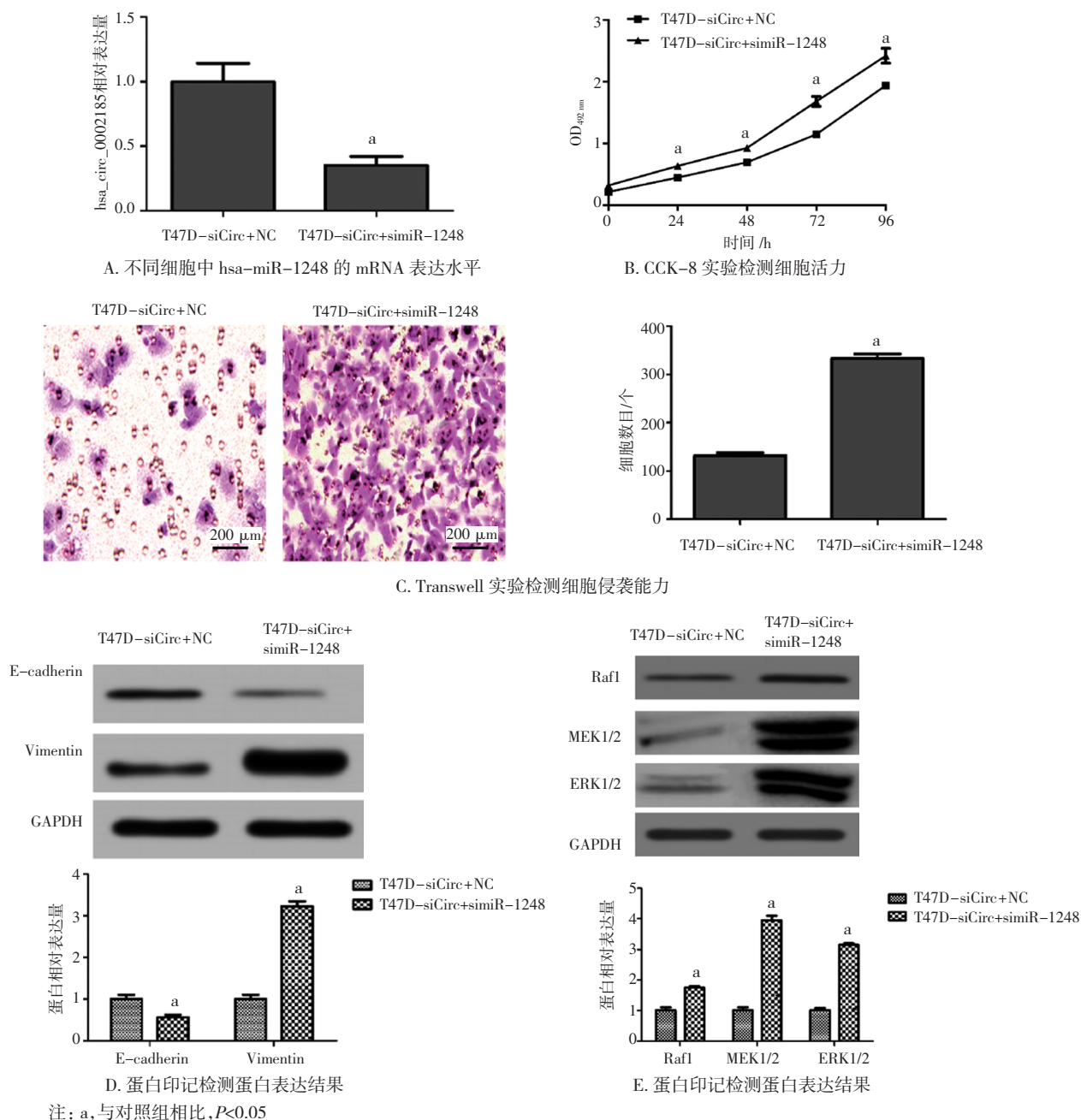


图9 下调 hsa-miR-1248 验证 hsa_circ_0002185 对 T47D 细胞的影响

3 讨论

乳腺癌是一种威胁全球女性身心健康、发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,其中发病率在全球范围呈逐年上升的趋势,我国又是乳腺癌发病的高发国家,近年来乳腺癌患者逐渐呈现低龄化趋势,乳腺癌已经成为社会重要的公共卫生问题^[7]。乳腺癌的发病机制复杂,发生发展机制由多种因素共同导致,虽然目前相关的研究很多,但分子机制尚未完全清楚^[8],因此大力开展乳腺癌机制研究、寻找有效靶点

并投入到临床治疗刻不容缓。环状 RNA(circRNA)是一种闭合环状结构的非编码 RNA,大量存在于生物体内,具有稳定性强、保守性高及组织表达特异性等特点,通过对转录和转录后的调控作用在肿瘤的发生发展过程中扮演重要角色^[9]。越来越多的研究发现^[10],circRNA 对乳腺癌细胞的增殖分化具有一定的抑制作用,但是其中的分子机制并没有深入的研究。因此本文通过成功构建乳腺癌沉默 hsa_circ_0002185 细胞系,探究 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞活性的影响。通过 CCK-8 检测发现,沉默 hsa_circ_0002185 细胞系的 OD 值在各个时间点都显

著低于空白对照组和空载体组,说明沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞活力,从而降低乳腺癌细胞增殖分化能力。

癌细胞迁移和侵袭能力是癌细胞扩散、复发转移的基础,因此抑制癌细胞迁移和侵袭能力是治疗癌症的关键^[11]。大量研究表明,许多动植物提取物都可以降低疾病细胞和癌细胞迁移和侵袭能力。庞长河等^[12]研究发现,去甲斑蝥素可以对神经胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力进行抑制;赵静等^[13]研究显示鹿茸提取物可以减弱心肌缺血损伤细胞的迁移能力。遗憾的是,癌细胞会对这些提取物产生耐药性,因此需要进一步研究如何减弱癌细胞迁移和侵袭能力。最近有研究发现,circRNA 以其高保守性和组织表达特异性等特点可以抑制癌细胞迁移和侵袭能力,并可以持续发挥抑制作用^[14]。Zhao W 等^[15]研究表明 hsa_circ_0002185 在口腔鳞状细胞癌的细胞和肿瘤组织中显著上调,在功能上,hsa_circ_0002185 在体外促进细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化,并在体内促进肿瘤生长。但是 hsa_circ_0002185 在乳腺癌中的作用机制还未有研究,因此本文利用 hsa_circ_0002185 沉默细胞系探究 hsa_circ_0002185 对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响。通过划痕愈合实验检测细胞迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力,结果显示沉默 hsa_circ_0002185 可以显著降低乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

上皮间质转化是指上皮细胞转化为间质细胞的生物学行为,在胚胎发育、慢性炎症、组织再生重建和肿瘤转移等过程中发挥重要作用。在肿瘤发生发展过程中,2 个非常重要的标记物分别是 E-cadherin 和 Vimentin,其中 E-cadherin 是代表上皮细胞的标记物,Vimentin 是代表间质细胞的标记物,通过检测 2 个蛋白的表达异常可以判断出肿瘤细胞的侵袭迁移能力变化情况^[16]。与对照组相比,hsa_circ_0002185 沉默细胞系中 E-cadherin 表达显著升高,Vimentin 表达显著降低。这提示 hsa_circ_0002185 可能通过调控乳腺癌细胞的上皮间质转化过程,从而增强细胞的迁移和侵袭能力。

研究表明,很多 circRNA 至少包含 1 个 miRNA 结合位点,多则包含上千个结合位点,circRNA 可以作为“海绵体”对 miRNA 进行吸附,进一步调控 miRNA 下游靶基因的表达,进一步对肿瘤细胞的侵袭和迁移能力进行影响^[17]。本研究应用 Circular RNA Interactome 数据库,预测出 hsa_circ_0002185 可能与 hsa-miR-1248 互补结合。尤琪^[18]研究表明,hsa-miR-1248 在胃癌组织中低表达,hsa-miR-1248 能够诱导胃癌细胞发生凋亡,同时具有抑制胃癌细胞迁移和侵袭的能力。本研究中,hsa_circ_0002185

沉默后,hsa-miR-1248 表达上升,提示 hsa_circ_0002185 促进乳腺癌细胞的增殖及上皮间质转化作用可能与下调 hsa-miR-1248 有关。根据 Targetscan 网站预测显示,hsa-miR-1248 可互补结合 Raf1,进一步分析显示 hsa-miR-1248 表达上升后,Raf1 蛋白表达降低。其中 Raf1 属于 Raf 激酶家族,是 MAPK/ERK 通路中 1 个非常关键的激酶,是研究得最为广泛也是功能最多的激酶^[19]。

MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,MAPK 信号通路可以对细胞增殖、分化和凋亡等许多细胞进程进行调控^[20]。该通路由三级蛋白激酶构成,分别是 MAPK 激酶激酶、MAPK 激酶和 MAPK,三级蛋白激酶通过级联反应依次磷酸化后进行信号传导^[21]。目前研究共发现 4 大 MAPK 信号通路,其中 MAPK/ERK 信号通路是最为经典也是研究最为深入的一条通路,由 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 构成^[22]。当上游结合蛋白 Ras 被外界刺激活化后,进一步激活 Raf1,Raf1 通过磷酸化 MEK1/2(P-MEK1/2)从而激活 MEK1/2,然后进一步磷酸化 ERK1/2(P-ERK1/2),使得 ERK1/2 被激活,ERK1/2 激活后进入细胞核中,激活转录因子的表达,进一步对细胞的活性及迁移侵袭能力进行调控^[23-25]。近年来,MAPK 信号通路在不同癌症中的研究越来越广泛,Zhang ZY 等^[26]研究表明,hsa_circRNA_101237 作为分子海绵吸附结合 miRNA-490-3p,进一步促进 MAPK1 表达,从而显著促进非小细胞肺癌细胞系的增殖、迁移和侵袭。高丹凤^[27]研究发现,hsa_circ-0006528 作为 miR-7-5p 的分子海绵抑制其活性,从而减少 miR-7-5p 对其靶基因 Raf1 的调控,进而影响下游 MAPK/ERK 通路来介导乳腺癌细胞的生长和转移。本文分析了 hsa_circ_0002185 对 Raf1、P-MEK1/2、MEK1/2、P-ERK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达量的影响,发现沉默 hsa_circ_0002185 可以抑制上述蛋白的表达。进一步回复实验结果显示 T47D 细胞中 hsa_circ_0002185 沉默后,hsa-miR-1248 表达上调,而下调 hsa-miR-1248 的表达后可逆转 hsa_circ_0002185 基因沉默后 T47D 细胞株的生物学特征,提示在乳腺癌细胞中,hsa_circ_0002185 可能通过靶向结合 hsa-miR-1248 并抑制其活性。当沉默 hsa_circ_0002185 后,则会降低 hsa_circ_0002185 对 hsa-miR-1248 的抑制作用,使得 hsa-miR-1248 的表达水平升高,发挥抑癌作用。hsa-miR-1248 进一步通过互补结合 Raf1,抑制 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 信号通路。

综上所述,环状 RNA hsa_circ_0002185 在乳腺癌中的高表达可以增强肿瘤细胞的活性、迁移和侵袭能力,这一作用机制可能是 hsa_circ_0002185 通过调控 hsa-miR-1248 上调 Raf1 水平,进而激活 MAPK/

ERK信号通路和 EMT 过程。

参 考 文 献

- [1] 易宗毕,马飞,徐兵河. 乳腺癌脑转移的基因突变特征及靶向治疗[J]. 国际肿瘤学杂志,2019,46(6):354-357.
- [2] 焦慧,张一宁,宋雨晴,等. 乳腺癌类器官研究进展及临床应用前景[J]. 中国组织工程研究,2021,25(7):1122-1128.
- [3] Price-Blackshear MA,Pratscher SD,Oyler DL,et al. Online couples mindfulness-based intervention for young breast cancer survivors and their partners:a randomized-control trial[J]. J Psychosoc Oncol, 2020,38(5):592-611.
- [4] 杨睿,陈俊霞. 环状 RNA has_circ_058514 在三阴性乳腺癌中的表达及作用研究[J]. 中国癌症杂志,2019,29(1):9-18.
- [5] Yang R,Chen JX. Effects of circular RNA has_circ_058514 on the development and progression of triple-negative breast cancer[J]. China Oncol, 2019,29(1):9-18.
- [6] Qu M,Li D,Zhao YL,et al. Exposure to low-dose nanopolystyrene induces the response of neuronal JNK MAPK signaling pathway in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Environ Sci Eur, 2020,32(1):1-11.
- [7] 苏洁之,郑立平,钟军华,等. 小白菊内酯通过 ERK/MAPK 通路诱导乳腺癌 MCF-7 细胞自噬的研究[J]. 中国药师,2019,22(7):1236-1239.
- [8] Su JZ,Zheng LP,Zhong JH,et al. Parthenolide induced autophagy of breast cancer MCF-7 cells via ERK/MAPK pathway[J]. China Pharm, 2019,22(7):1236-1239.
- [9] Schrijver WAME,Suijkerbuijk KPM,van Gils CH,et al. Receptor conversion in distant breast cancer metastases;a systematic review and meta-analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2018,110(6):568-580.
- [10] Bourgeois-Daigneault MC,Roy DG,Aitken AS,et al. Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy[J]. Sci Transl Med, 2018,10(422):eaal1641.
- [11] Liu T,Ye P,Ye YY,et al. Circular RNA hsa_circRNA_002178 silencing retards breast cancer progression via microRNA-328-3p-mediated inhibition of COL1A1[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(3):2189-2201.
- [12] Ma XR,Liu C,Gao CD,et al. circRNA-associated ceRNA network construction reveals the circRNAs involved in the progression and prognosis of breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2020,235(4):3973-3983.
- [13] 李贝,吴奇,李智宇,等. 肿瘤相关脂肪细胞促进乳腺癌侵袭及转移机制的研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2019,33(8):772-774.
- [14] Li B,Wu Q,Li ZY,et al. Role of cancer-associated adipocytes in promoting invasion and metastasis of breast cancer[J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2019,33(8):772-774.
- [15] 庞长河,薛亚珂,董阳,等. 去甲斑蝥素通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶信号通路对胶质瘤 U87 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(6):1080-1082.
- [16] Pang CH,Xue YK,Dong Y,et al. Effects of norcantharidin on proliferation and apoptosis of glioma cells via mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase signaling pathway[J]. Chin J Exp Surg, 2018,35(6):1080-1082.
- [17] 赵静,孙娅楠,李超华,等. 鹿茸蛋白提取物对小鼠心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2018,24(11):1537-1539,1596.
- [18] Zhao J,Sun YN,Li CH,et al. Protective effect of velvet antler protein extract on myocardial ischemia injury in mice[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2018,24(11):1537-1539,1596.
- [19] Wang N,Gu YT,Li L,et al. Circular RNA circMYO9B facilitates breast cancer cell proliferation and invasiveness via upregulating FOXF4 expression by sponging miR-4316[J]. Arch Biochem Biophys, 2018,653:63-70.
- [20] Zhao W,Cui YM,Liu LN,et al. Splicing factor derived circular RNA circUHRF1 accelerates oral squamous cell carcinoma tumorigenesis via feedback loop[J]. Cell Death Differ, 2020,27(3):919-933.
- [21] Otero-Marrah V,Hawsawi O,Henderson V,et al. Epithelial-mesenchymal transition(EMT) and prostate cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2018,1095:101-110.
- [22] Zhang LY. Circular RNA:the main regulator of energy metabolic reprogramming in cancer cells[J]. Thorac Cancer, 2020,11(1):6-7.
- [23] 尤琪. 汉防己甲素促胃癌细胞凋亡过程中相关 miR-1248、miR-193b-3p 作用研究[D]. 广州:广东药科大学,2017.
- [24] You Q. The study of the role of miR-1248 and miR-193b-3p on apoptosis processes induced by tetrandrine in human gastric cancer[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.
- [25] Ma YC,Wang Y,Wang L,et al. Triptolide prevents proliferation and migration of esophageal squamous cell cancer via MAPK/ERK signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019,851:43-51.
- [26] Perez Kerkvliet C,Dwyer A,Regan Anderson T,et al. SUN-008 the glucocorticoid receptor is essential for TGFβ and p38 MAPK mediated cancer phenotypes in triple negative breast cancer[J]. J Endocr Soc, 2019,3(Suppl 1):SUN-8.
- [27] Dai YF,Qiang WJ,Yu XK,et al. Guizhi Fuling Decoction inhibiting the PI3K and MAPK pathways in breast cancer cells revealed by HTS2 technology and systems pharmacology[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2020,18:1121-1136.
- [28] Cheng XS,Huo YN,Fan YY,et al. Mindin serves as a tumour suppressor gene during colon cancer progression through MAPK/ERK signalling pathway in mice[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(15):8391-8404.
- [29] Pereira SS,Monteiro MP,Costa MM,et al. MAPK/ERK pathway inhibition is a promising treatment target for adrenocortical tumors[J]. J Cell Biochem, 2019,120(1):894-906.
- [30] 赵晨阳,高岭,任文豪,等. circRNA-PKD2 通过 MAPK 信号通路对口腔鳞癌细胞增殖及凋亡的调控[C]//第十四次中国口腔颌面外科学术会议论文汇编. 重庆,2018:263.
- [31] Zhao CY,Gao L,Ren WH,et al. circRNA-PKD2 regulates the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells through MAPK signaling pathway[C]// Paper collection of the 14th Chinese Oral and Maxillofacial Surgery Conference. Chongqing, 2018:263.
- [32] Li QT,Feng YM,Ke ZH,et al. KCNN4 promotes invasion and metastasis through the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma[J]. J Investig Med, 2020,68(1):68-74.
- [33] Zhang ZY,Gao XH,Ma MY,et al. CircRNA_101237 promotes NSCLC progression via the miRNA-490-3p/MAPK1 axis[J]. Sci Rep, 2020,10(1):9024.
- [34] 高丹凤. Has_circ_006528 促进人乳腺癌增殖、侵袭和迁移的作用及机制研究[D]. 无锡:江南大学,2018.
- [35] Gao DF. Study on the role and mechanism of Has_circ_006528 in promoting human breast cancer proliferation, invasion and migration[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.

(责任编辑:周一青)