

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.009

· 临床研究 ·

circNEIL3 通过靶向 miR-4784 调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭

张宝^a, 王燕^b, 任维敏^a(济南市中西医结合医院 a. 胸外两腺科; b. 肿瘤科, 山东 济南 271100)

[摘要] **目的:** 研究环状 RNA nei 样 DNA 糖化酶 3 (circNEIL3) 和微小 RNA (miR)-4784 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 收集 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在济南市中西医结合医院经组织病理诊断为乳腺癌并行手术切除的 45 例乳腺癌患者的癌组织和配对癌旁组织, qPCR 法检测乳腺癌组织、癌旁组织中 circNEIL3 和 miR-4784 的相对水平。将 circNEIL3 的小干扰 RNA (si-circNEIL3)、miR-4784 模拟物、si-circNEIL3+miR-4784 抑制物分别转染 MDA-MB-231 细胞, 采用 CCK-8 法、平板克隆实验、划痕愈合实验、Transwell 实验检测 circNEIL3 和 miR-4784 表达对细胞活力、克隆形成、迁移和侵袭的影响。双荧光素酶报告基因实验、RNA 免疫沉淀 (RIP) 和 RNA pull-down 实验检测 circNEIL3 和 miR-4784 之间相互作用。**结果:** 乳腺癌组织中 circNEIL3 呈高表达 ($P<0.05$), miR-4784 呈低表达 ($P<0.05$)。干扰 circNEIL3 显著降低 MDA-MB-231 细胞活力、克隆形成数、划痕愈合率以及侵袭数 (均 $P<0.05$)。过表达 miR-4784 显著降低 MDA-MB-231 细胞活力、克隆形成数、划痕愈合率以及侵袭数 (均 $P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验、RIP 和 RNA pull-down 实验均证实 circNEIL3 与 miR-4784 可直接结合, 干扰 circNEIL3 能明显上调 miR-4784 表达 ($P<0.05$), 过表达 circNEIL3 能明显下调 miR-4784 表达 ($P<0.05$)。抑制 miR-4784 表达部分逆转干扰 circNEIL3 对 MDA-MB-231 细胞活力、克隆形成、迁移和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$)。**结论:** 干扰 circNEIL3 通过靶向上调 miR-4784 表达抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 乳腺癌; circNEIL3; miR-4784; MDA-MB-231 细胞; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0707-08

circNEIL3 regulates the proliferation, migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells through targeting miR-4784

ZHANG Bao^a, WANG Yan^b, REN Weimin^a(a. Department of Extrathoracic Glands; b. Department of Oncology, Jinan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinan, Shandong, 271100)

[Abstract] Objective: To study the influence of circRNA nei-like DNA glucoamylase 3 (circNEIL3) and microRNA (miR)-4784 on the proliferation, migration, and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods:** The cancer tissues and paired paracancerous tissues surgically removed from 45 breast cancer patients histopathologically diagnosed with breast cancer in Jinan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine from January 2018 to December 2019 were collected. qPCR were applied to measure the relative levels of circNEIL3 and miR-4784 in breast cancer tissues and paracancerous tissues. circNEIL3 small interfering RNA (si-circNEIL3), miR-4784 mimics, and si-circNEIL3+miR-4784 inhibitors were transfected into MDA-MB-231 breast cancer cells, respectively. CCK-8 assay, plate cloning assay, scratch healing assay, and Transwell assay were performed to detect the effects of circNEIL3 and miR-4784 expressions on the cell viability, clone formation, migration and invasion. Dual-luciferase reporter assay, RNA immunoprecipitation (RIP), and RNA pull-down assay were used to detect the interactions between circNEIL3 and miR-4784. **Results:** The relative level of circNEIL3 in breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$) while the relative level of miR-4784 was significantly lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$). Interference with circNEIL3 significantly reduced the viability, clonal formation numbers, wound healing rate, and invasion numbers of MDA-MB-231 cells ($P<0.05$). Overexpression of miR-4784 significantly reduced the viability, clonal formation numbers, wound healing rate, and invasion numbers of MDA-MB-231 cells ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene assay, RIP, and RNA pull-down assay confirmed that circNEIL3 directly binds to miR-4784. Interference with circNEIL3 significantly up-regulated miR-4784 expression ($P<0.05$), and overexpression of circNEIL3 significantly down-regulated miR-4784 expression ($P<0.05$). miR-4784 inhibition partially reversed the inhibitory effect of interference with circNEIL3 on the viability, colony formation, migration, and invasion of MDA-MB-231 cells

[作者简介] 张宝(1982-), 男, 本科, 主治医师, 主要从事胸外两腺的临床研究, E-mail: zfumyt@163.com

[通信作者] 任维敏, E-mail: rwm-1984@163.com

($P < 0.05$). **Conclusion:** Interference with circNEIL3 inhibits the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells by targeting and up-regulating miR-4784 expression.

[Key words] circRNA nei-like DNA glucoamylase 3 (circNEIL3); breast cancer; microRNA-4784; MDA-MB-231 cell; cell proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 707-714. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.009]

乳腺癌是全球性最常见恶性肿瘤之一。随着诊断和综合治疗技术的不断进步,乳腺癌患者的整体生存和预后有所改善,但转移仍是乳腺癌患者死亡的主要原因^[1-2]。因此,确定乳腺癌转移的潜在机制、开发新的靶点以改善预后迫在眉睫。

环状RNA(circRNA)是在哺乳动物细胞中普遍存在的具有共价闭合环的单链RNA,其通过充当微小RNA(miRNA)或蛋白抑制剂调节细胞增殖、代谢、迁移过程,进而在肿瘤进展中发挥重要的生物学功能^[3-4]。有研究^[5-6]表明,circRNA的异常表达与乳腺癌细胞的增殖、凋亡、迁移和化疗耐药密切相关。circRNA nei样DNA糖化酶3(circular RNA nei-like DNA glycosylase 3, circNEIL3)是由NEIL3基因8~10号外显子环化而成,剪接长度为1 246 bp,最近有报道^[7]称circNEIL3可增强宫颈癌细胞增殖能力,对宫颈癌进展具有促进作用。然而,circNEIL3在乳腺癌中的表达、功能和生物学机制仍未可知。靶基因预测显示miR-4784是circNEIL3的潜在靶基因,已有研究证实miR-4784作为长基因间非蛋白编码RNA 1133(LINCO1133)的直接靶点,介导LINCO1133对宫颈癌恶性生长、侵袭和上皮间质转化的抑制作用^[8]。但miR-4784在乳腺癌中的功能、circNEIL3是否靶向miR-4784发挥作用尚不清楚。因此,本研究分析乳腺癌组织中circNEIL3、miR-4784表达水平,检测circNEIL3和miR-4784表达改变对乳腺癌细胞生物学行为的影响,以期揭示两者间的相互作用。

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织来源、细胞和试剂

收集2018年1月至2019年12月在济南市中西医结合医院经组织病理诊断为乳腺癌并行手术切除的45例乳腺癌患者的癌组织和配对癌旁组织。将所有组织样本经液氮速冻后,置于-80℃冰箱保存待测。患者年龄46~68岁,中位年龄55岁。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他抗癌治疗。所有患者均签订知情同意书,本研究经济南市中西医结合医院医学伦理委员会批准(审批号:2018-01-003)。

乳腺癌细胞MDA-MB-231购自中国科学院上海细胞库;DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公

司;Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司;PrimeScript逆转录Master Mix购自大连宝生物公司;TRIzol试剂、SYBR Green qPCR Mix购于上海碧云天生物公司;circNEIL3小干扰RNA(si-circNEIL3)、miR-4784模拟物(mimics)、miR-4784抑制物(anti-miR-4784)以及阴性对照(si-NC、miR-NC、anti-miR-NC)、荧光素酶报告载体购均自上海吉玛制药公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本同仁公司;包被基质胶的Transwell小室购自美国BD公司;E-cadherin小鼠单克隆抗体(sc-71008)、N-cadherin小鼠单克隆抗体(sc-8424)、羊抗小鼠IgG抗体(sc-2005)、GAPDH小鼠单克隆抗体(sc-47724)均购自美国Santa Cruz公司;双荧光素酶报告系统试剂盒购自美国Promega公司;Magna RIP试剂盒(17-700)购自美国Millipore公司。

1.2 细胞培养和分组

MDA-MB-231细胞采用DMEM培养基(含100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素和10%胎牛血清)培养,放入37℃、含5%CO₂湿润培养箱中培养,胰酶消化80%融合细胞,按照1:2比例传代,每周换液2次。

将对数期MDA-MB-231细胞以2×10³个/孔的密度接种在6孔板,在细胞50%融合时参照Lipofectamine 3000说明书进行细胞转染,转染48 h后收集MDA-MB-231细胞,qPCR检测细胞中circNEIL3、miR-4784表达水平以验证转染效果。根据转染寡核苷酸不同分为si-NC组(转染si-NC)、si-circNEIL3组(转染si-circNEIL3)、pcDNA组(转染pcDNA)、pcDNA-circNEIL3组(转染pcDNA-circNEIL3)、miR-NC组(转染miR-NC)、miR-4784组(转染miR-4784 mimics)、si-circNEIL3+anti-miR-NC组(转染si-circNEIL3和anti-miR-NC)、si-circNEIL3+anti-miR-4784组(转染si-circNEIL3和anti-miR-4784)。

1.3 qPCR检测乳腺癌组织中circNEIL3和miR-4784的表达

采用TRIzol试剂从组织样本中提取总RNA,随后用分光光度计测定总RNA纯度和浓度。使用PrimeScript反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA,然后利用SYBR Green qPCR Mix进行qPCR。GAPDH用作circNEIL3的内参,U6用作miR-4784的内参。用2^{-ΔΔCt}方法计算circNEIL3和miR-4784相对表达量。引物序列见表1。每种样品设置3个复管。

1.4 CCK-8 法和平板克隆实验检测 MDA-MB-231 细胞活力

CCK-8法:取各组的MDA-MB-231细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,培养48h后每孔加入CCK-8试剂10 μ L。37 $^{\circ}$ C避光反应2h后,用酶标仪测定各孔在450nm处的光密度(D)值。每个样品设置3个复孔。

表1 qPCR引物序列

基因	引物序列(5'-3')
circNEIL3	上游:GCATTCT CCGAGTTGTGGG
	下游:CTTCACTCTTGAGCACTGAATTTTC
GAPDH	上游:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
	下游:AGGGGCCATCCACAGTCTTC
miR-4784	上游:TGAGGAGATG CTGGGACT
	下游:GAACATGTCTGCGTATCTC
miR-3150b-3p	上游:GAGGAGATCGTCGAGGT
	下游:GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCCCA
miR-137	上游:CCATTCATTCGTTATTGCTTAAAGA
	下游:TATGCTTGTTCTCGTCTCTGTGTC
miR-1184	上游:GCCGAGCCTGCAGCGACTTGA
	下游:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
miR-432-5p	上游:AACGAGACGACGACAGACT
	下游:CTTGAGTAGGTCATTGGGT
miR-218-5p	上游:AACACGAACTAGATTGGTACA
	下游:AGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	上游:CTCGCTTCGGCAGCACA
	下游:AACGCTTCACGAATTTGCG

平板克隆实验:取各组的MDA-MB-231细胞以 2×10^2 个/孔的密度种于6孔板,轻轻旋动平板使细胞分散均匀。培养箱常规培养2~3周,当6孔板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液用磷酸盐缓冲液(PBS)小心浸洗2次。用4%多聚甲醛固定细胞15min,0.1%结晶紫染色20min。在显微镜下计数>50个细胞的克隆数,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆形成数/细胞总数 $\times 100\%$ 。每个样品设置3个复孔。

1.5 划痕愈合实验检测MDA-MB-231细胞的迁移能力

取处理各组的MDA-MB-231细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板,当细胞融合为一层时,用200 μ L枪头尖端均匀划痕,PBS小心洗涤细胞以除去细胞碎片,加入无血清培养基,放入培养箱培养。培养0、24h时在显微镜下测量划痕距离。划痕愈合率=(0h划痕距离-24h划痕距离)/0h划痕距离 $\times 100\%$ 。每组设置3个复孔。

1.6 Transwell实验检测细胞侵袭

将各组MDA-MB-231细胞重悬在无血清培养基

中,取约200 μ L、 4×10^4 个MDA-MB-231细胞接种于Transwell上室。以含10%胎牛血清的500 μ L培养基作为趋化剂加入到24孔板下室。培养24h,用棉签轻轻擦拭Transwell小室膜上表面的基质胶和细胞,Transwell小室膜下表面的细胞经4%多聚甲醛固定后用0.1%结晶紫染色30min。在显微镜下随机选取5个视野计数并拍照。每组检测设置3个复孔。

1.7 蛋白质印记法检测E-cadherin、N-cadherin蛋白表达

采用RIPA缓冲液裂解各组MDA-MB-231细胞,收集上清液,通过BCA试剂盒测定蛋白浓度。按照30 μ g/泳道进行SDS-PAGE,蛋白分离后经湿法转膜装置转移至聚偏二氟乙烯膜上。室温下,5%脱脂奶粉处理2h后,加入E-cadherin(1:800)、N-cadherin(1:500)一抗溶液反应2h,再加入二抗(1:1000)溶液处理1h。使用化学发光试剂检测蛋白条带。以GDPAH为内参,采用ImageJ软件分析各条带灰度值以检测目的蛋白相对表达水平。

1.8 双荧光素酶报告实验验证circNEIL3与miR-4784的靶向关系

将含有miR-4784结合位点的circNEIL3野生型(WT)序列片段或突变型(MUT)序列片段分别插入到报告质粒pRL-SV40荧光素酶报告基因下游,构建荧光素酶报告载体WT-circNEIL3、MUT-circNEIL3。利用Lipofectamine 3000将上述荧光素酶报告载体(500ng)分别与miR-4784 mimics或miR-NC(最终浓度10nmol/L)共转染MDA-MB-231细胞。48h后,用双重荧光素酶报告系统试剂盒测量萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。每组检测设置3个复孔。

1.9 RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验检测circNEIL3和miR-4784之间相互作用

使用Magna RIP RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒进行RIP实验。使用RIP裂解液裂解MDA-MB-231细胞,并将100 μ L全细胞提取物与含有与人抗Ago2抗体(1:50)缀合的磁珠在4 $^{\circ}$ C下处理6~8h。正常小鼠IgG抗体(1:100)用作阴性对照。随后,将样品用洗涤缓冲液洗涤,并与蛋白酶K在55 $^{\circ}$ C下处理30min,以从磁珠中分离RNA-蛋白质复合物。然后,使用TRIzol试剂提取免疫沉淀的RNA并进行qPCR分析circNEIL3和miR-4784的富集。

1.10 RNA pull-down分析circNEIL3和miR-4784之间相互作用

用50nmol/L的生物素标记的野生型或突变型miR-4784(Bio-miR-4784-WT或Bio-4784-944-MUT)或阴性对照Bio-miR-NC转染MDA-MB-231细胞。将细胞培养48h后,收获并裂解细胞。随后,将M-28链霉亲和素磁珠添加到细胞裂解物中,在4 $^{\circ}$ C下处理3h以分离生

物素偶联的RNA复合物。最后,将珠子在洗涤缓冲液中洗涤,并使用qPCR法分析结合的RNA。

1.11 统计学方法

所有统计分析均采用SPSS 21.0统计软件进行,所有实验均独立重复3次,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用独立样本 t 检验进行两组间比较,多组间比较采用单因素方差分析和SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中circNEIL3呈高表达、miR-4784呈低表达

乳腺癌组织中circNEIL3的相对水平为 2.81 ± 0.36 ,显著高于癌旁组织的 1.00 ± 0.07 ($P<0.05$),见图1A;采用StarBase在线数据库(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)对circNEIL3的靶miRNA进行分析

预测,在预测的靶miRNA中筛选了与乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌等女性癌症相关的6个潜在靶基因(miR-3150b-3p、miR-137、miR-4784、miR-1184、miR-432-5p、miR-218-5p),qPCR结果显示,乳腺癌组织中上述miRNA的表达水平均降低,其中乳腺癌组织中miR-4784的相对水平为 0.39 ± 0.04 ,显著低于癌旁组织的 1.00 ± 0.06 ($P<0.05$),故选取miR-4784作为circNEIL3的靶基因进行功能实验,见图1B。

根据45例患者中circNEIL3的中位表达水平(2.81),将患者分为高表达组(>2.81 , $n=24$)和低表达组(≤ 2.81 , $n=21$)。收集所有患者的临床特征(表2),分析circNEIL3表达与乳腺癌患者临床病理特征之间的关系(表2)。结果显示,circNEIL3的高表达与乳腺癌的肿瘤大小($P=0.027$)、肿瘤TNM分期($P=0.012$)、淋巴结转移($P=0.017$)和远处转移($P=0.004$)等有关联。

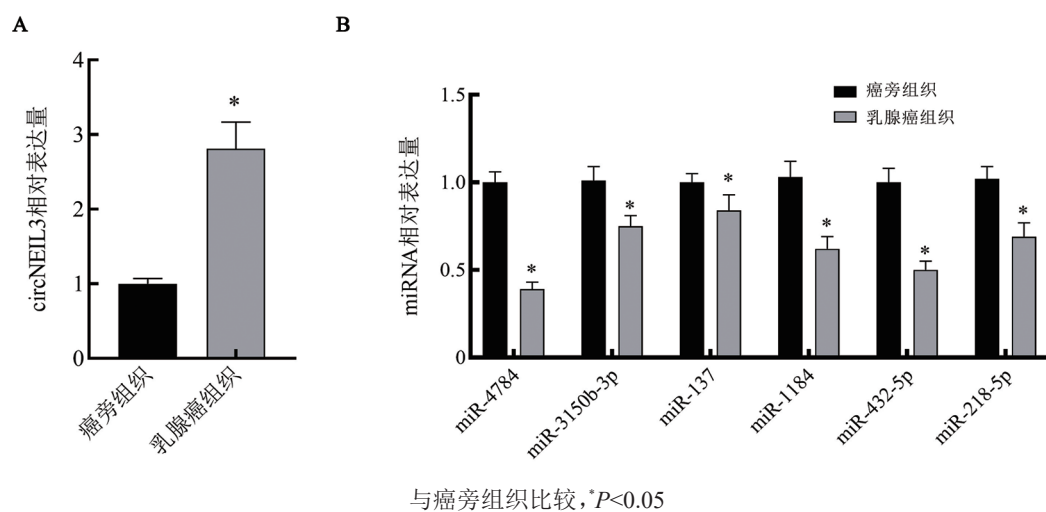


图1 乳腺癌组织中circNEIL3(A)、miR-4784、miR-3150b-3p、miR-137、miR-1184、miR-432-5p、miR-218-5p(B)的相对表达水平

2.2 干扰circNEIL3表达抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖能力

si-circNEIL3组MDA-MB-231细胞中circNEIL3相对水平显著低于si-NC组[(0.24 ± 0.02) vs (1.00 ± 0.00), $P<0.05$, $t=114.000$],表明转染si-circNEIL3后MDA-MB-231细胞中circNEIL3表达受到抑制。与si-NC组比较,si-circNEIL3组MDA-MB-231细胞活力[(0.32 ± 0.03) vs (0.69 ± 0.05), $P<0.05$, $t=19.036$]、克隆形成率[(21.25 ± 4.08)% vs (50.48 ± 6.39)%, $P<0.05$, $t=11.566$]均明显降低。见图2。

2.3 干扰circNEIL3表达抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭能力

与si-NC组比较,si-circNEIL3组MDA-MB-231细胞划痕愈合率[(25.24 ± 2.18)% vs (69.48 ± 5.92)%, $P<0.05$, $t=21.038$]、侵袭数[(34.69 ± 3.17) vs ($91.84\pm$

7.28)个, $P<0.05$, $t=21.593$]、N-cadherin蛋白相对水平均显著下降($P<0.05$),E-cadherin蛋白相对水平显著升高($P<0.05$)。见图3。

2.4 circNEIL3靶向调控miR-4784表达

StarBase在线数分析预测到miR-4784与circNEIL3存在连续性特异结合位点,见图4A。荧光素酶活性检测结果见图4B,与WT-circNEIL3共转染,转染miR-4784 mimics后MDA-MB-231细胞的相对荧光素酶活性与转染miR-NC比较显著下降($P<0.05$);与MUT-circNEIL3共转染,转染miR-4784 mimics后MDA-MB-231细胞的相对荧光素酶活性与转染miR-NC比较差异无统计学意义($P>0.05$)。生物素标记的RNA pull-down结果显示,circNEIL3被Bio-miR-4784-WT拉下,而不是Bio-miR-4784-MUT(图4C);RIP检测结果显示,相对于IgG对照组,

表2 乳腺癌患者中circNEIL3 表达与临床病理特征的相关性

临床特征	n	circNEIL3 表达		P
		低(n=21)	高(n=24)	
年龄/岁				0.493
≥55	19	10	9	
<55	26	11	15	
肿瘤大小/cm				0.027
≥2	15	3	12	
<2	30	18	12	
TNM阶段				0.012
I - II	21	14	7	
III-IV	24	7	17	
淋巴结转移				0.017
有	18	4	14	
无	27	17	10	
远处转移				0.004
无	24	16	8	
有	21	5	16	

circNEIL3 和 miR-4784 在 Ago2 复合物中高度富集 (图 4D)。此外, qPCR 分析 circNEIL3 对 miR-4784 调控作用, 结果显示, pcDNA-circNEIL3 组 MDA-MB-231 细胞中 miR-4784 的相对水平显著低于 pcDNA 组 [(0.43±0.04) vs (1.00±0.05), $t=26.706$, $P<0.05$]; si-circNEIL3 组 MDA-MB-231 细胞中 miR-4784 的相对水平显著高于 si-NC 组 [(3.09±0.25) vs (1.02±0.07), $P<0.05$, $t=23.920$]。

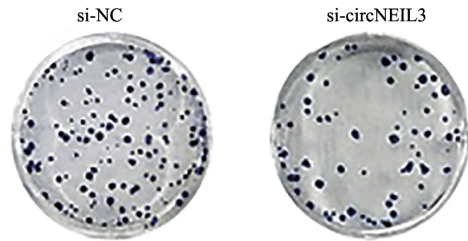
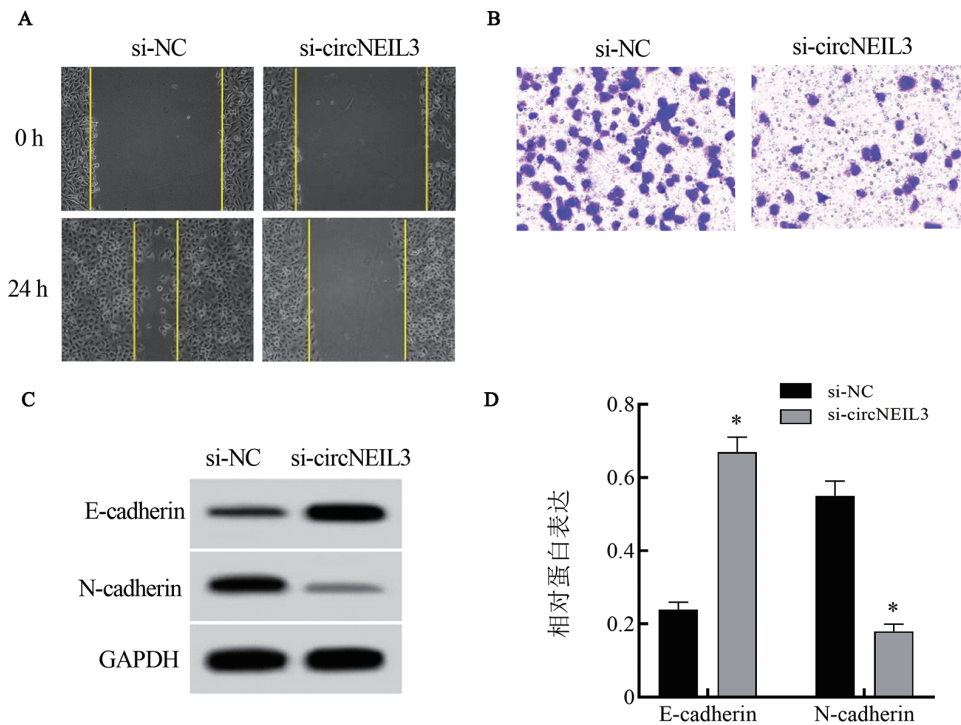


图2 干扰circNEIL3 表达影响 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响



与 si-NC 组比较, * $P<0.05$

A: 干扰 circNEIL3 表达影响 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 (划痕愈合实验, ×200); B: 干扰 circNEIL3 表达影响 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响 (结晶紫染色, ×200); C、D: 干扰 circNEIL3 表达影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响;

图3 干扰 circNEIL3 表达影响 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭的影响

2.5 miR-4784 过表达抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

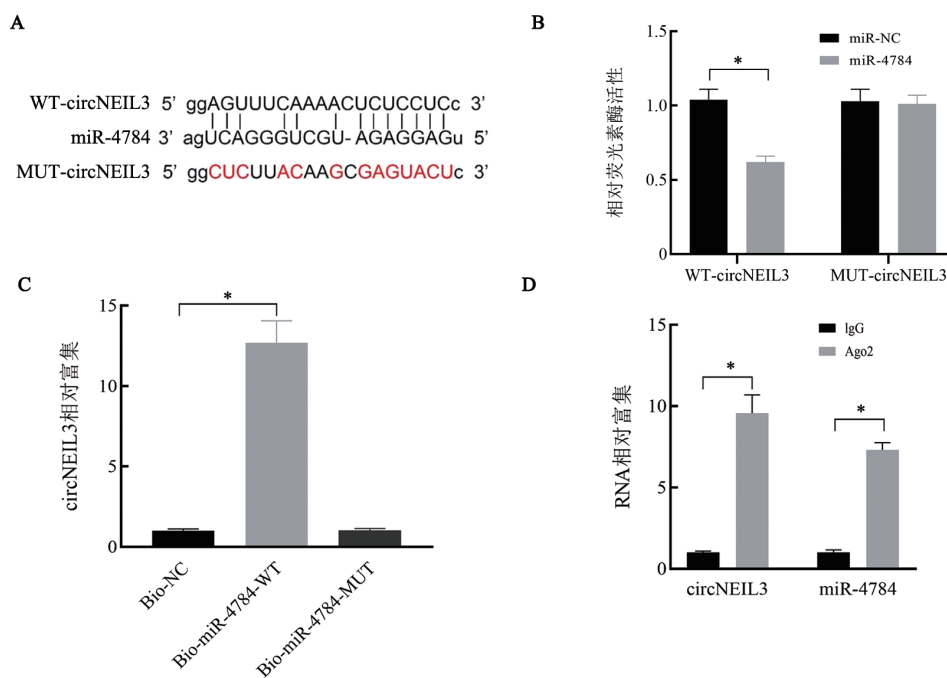
miR-4784 组 MDA-MB-231 细胞中 miR-4784 的相对水平显著高于 miR-NC 组 [(2.78±0.23) vs (1.00±0.00), $P<0.05$, $t=23.217$], 提示转染 miR-4784 mimics

后 MDA-MB-231 细胞含量升高 miR-4784 的含量升高。与 miR-NC 组比较, miR-4784 组 MDA-MB-231 细胞活力 [(0.39±0.03) vs (0.66±0.05), $P<0.05$, $t=13.891$]、克隆形成率 [(24.00±4.15)% vs (51.95±7.32)% , $P<0.05$, $t=9.965$]、划痕愈合率 [(33.07±

3.29)% vs (57.07±5.45)%, $P<0.05$, $t=11.310$]、侵袭数 [(41.94±4.12) vs (95.51±8.12) 个, $P<0.05$, $t=17.650$]、N-cadherin 蛋白表达水平均显著下降 ($P<0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。见图 5。

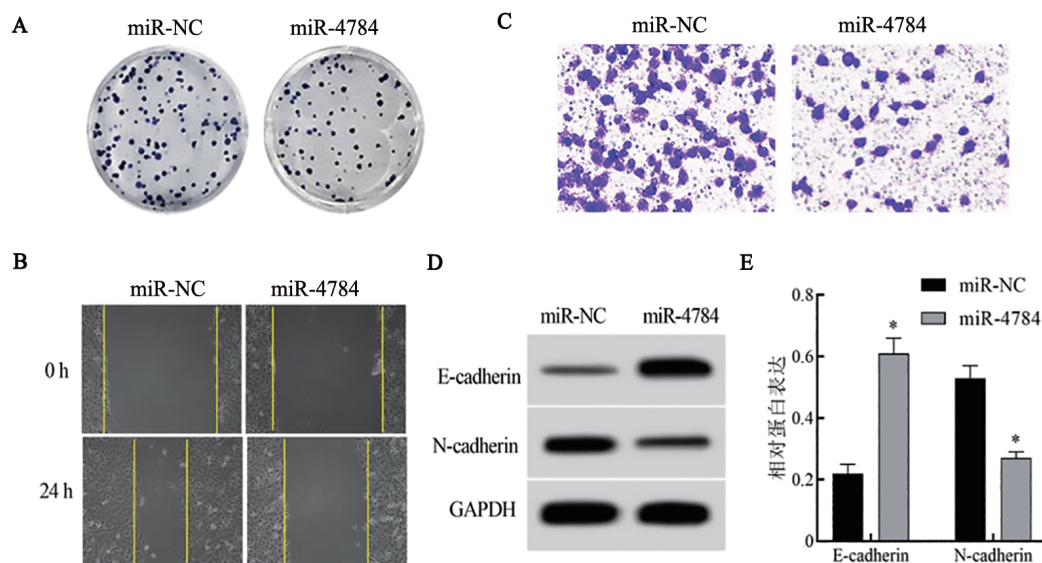
2.6 抑制 miR-4784 表达逆转了干扰 circNEIL3 表达对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用

与 si-circNEIL3+anti-miR-NC 组比较, si-circNEIL3+anti-miR-4784 组 MDA-MB-231 细胞中 miR-4784 表达水平显著降低 [(0.36±0.03) vs (1.00±0.00), $P<0.05$, $t=64.000$], 细胞活力 [(0.59±0.05) vs (0.31±0.03), $P<0.05$, $t=14.406$]、克隆形成率 [(43.97±6.05)% vs (20.31±3.29)%, $P<0.05$, $t=10.307$]、划痕愈合率 [(57.77±



A: 生物信息学数据库中预测的 circNEIL3 和 miR-4784 的靶向结合序列; B: 用于验证 circNEIL3 和 miR-4784 之间关系的双荧光素酶测定结果; C: 使用 qRT-PCR 在由生物素化 miR-4784 探针拉下的样品中检测 circNEIL3 富集; D: RIP 实验证实 circNEIL3 和 miR-4784 可以被 Ago2 抗体沉淀。* $P<0.05$

图 4 circNEIL3 靶向调控 miR-4784 表达



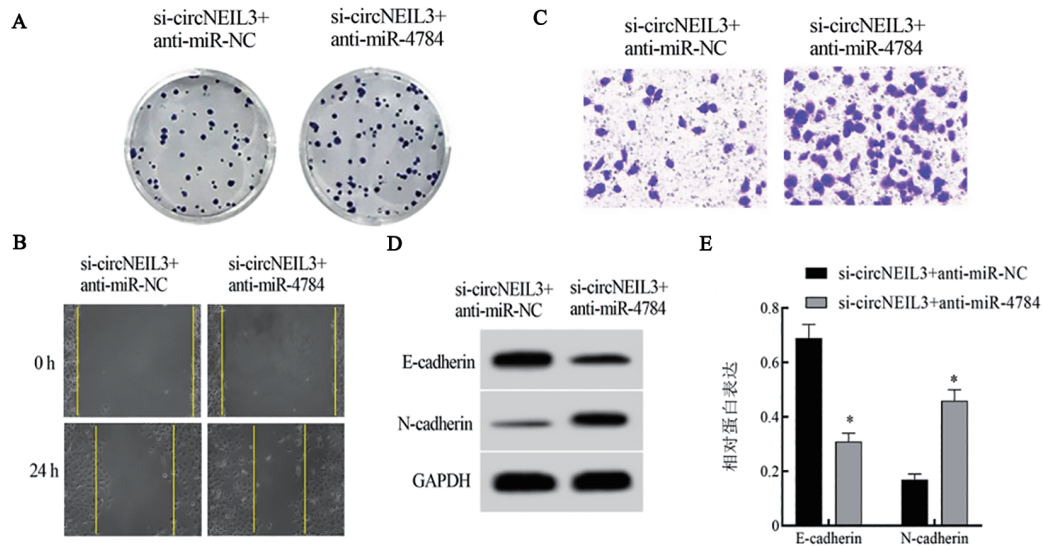
与 miR-NC 组比较, * $P<0.05$

A: 过表达 miR-4784 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响; B: 过表达 miR-4784 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响(划痕愈合实验, ×200); C: 过表达 miR-4784 对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响(结晶紫染色, ×200); D、E: 过表达 miR-4784 对 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响。

图 5 过表达 miR-4784 对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

5.52)% vs (24.22±2.18)%, $P<0.05$, $t=16.959$]、侵袭数[(80.47±7.31) vs (33.21±3.12)个, $P<0.05$, $t=17.838$]、N-cadherin蛋白的相对水平均显著升高($P<0.05$),

E-cadherin蛋白的相对水平显著降低($P<0.05$)。见图6。



与 si-circNEIL3+anti-miR-NC 组比较, * $P<0.05$

A: 各组 MDA-MB-231 细胞克隆形成情况; B: 各组 MDA-MB-231 细胞迁移情况(划痕愈合实验, ×200); C: 各组 MDA-MB-231 细胞侵袭情况(结晶紫染色, ×200); D、E: 抑制 miR-4784 表达逆转了干扰 circNEIL3 表达对 MDA-MB-231 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的作用

图6 抑制miR-4784表达逆转了干扰circNEIL3表达对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的作用

3 讨论

circRNA 具有高度稳定性、保守性、组织和细胞表达特异性,具有多种功能,参与调控肿瘤进展的多个过程,是潜在的肿瘤诊断标记物和抗肿瘤治疗靶点^[9-11]。多项研究表明 circRNA 表达异常与乳腺癌进展相关。如,LIU 等^[12]发现, circ_001783 在乳腺癌组织和细胞中过表达,且 circ_001783 的高表达与乳腺癌患者预后不良相关。XU 等^[13]发现, circRNA TADA2A-E6 (circTADA2A-E6) 低表达的乳腺癌患者预后较差,上调 circTADA2A-E6 可抑制乳腺癌细胞体外增殖、迁移、侵袭能力,具有抑瘤作用。LIU 等^[14]证实, circ_002178 在乳腺癌中表达上调,抑制 circ_002178 表达通过上调 miR-328-3p 能够抑制乳腺癌细胞能力代谢,降低细胞活力和成管能力。

本研究发现, circNEIL3 在乳腺癌组织中呈高表达。体外功能分析表明, 干扰 circNEIL3 表达能够降低 MDA-MB-231 细胞活力和克隆形成能力, 抑制细胞迁移和侵袭。LI 等^[15]研究表明, 肝癌中 circNEIL3 表达上调, 下调 circNEIL3 表达可显著诱导肝癌细胞凋亡和周期阻滞, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 这与本研究中干扰 circNEIL3 表达的抗肿瘤作用吻合。此外, SHEN 等^[16]发现, 胰腺导管癌中 circNEIL3 表达上调, 干扰 circNEIL3

通过靶向 miR-320-5p 诱导 G0~G1 期阻滞, 并抑制上皮-间质转化(EMT)。EMT 是肿瘤转移过程中的关键事件, 在此过程中细胞间粘附、极性上皮特征消失, 获得运动和侵袭能力等间质特征^[17-18]。本研究中干扰 circNEIL3 明显促进上皮表型 E-cadherin 蛋白表达、抑制间质表型 N-cadherin 蛋白表达, 这表明 circNEIL3 通过促进 EMT 进程影响乳腺癌细胞迁移和侵袭。

miR-4784 最初被证实与骨关节炎软骨细胞增生有关^[19]。近年研究发现 miR-4784 在癌症中发挥作用。肝癌中 miR-4784 表达降低, 敲减 LINC01134 通过上调 miR-4784 明显抑制肝癌细胞增殖和集落形成^[20]。卵巢癌中 miR-4784 表达下调, 过表达 miR-4784 能够抑制卵巢癌细胞增殖、迁移等^[21]。

本研究发现乳腺癌组织中 miR-4784 呈低表达, 生物信息学网站检索到 circNEIL3 与 miR-4784 存在配对碱基, 双荧光素酶报告分析验证了 miR-4784 是 circNEIL3 的潜在靶基因; RIP 和 RNA pull-down 检测结果进一步证实 circNEIL3 和 miR-4784 可以在 MDA-MB-231 细胞中结合, 表明 circNEIL3 可以靶向并结合 MDA-MB-231 细胞中的 miR-4784, 且二者呈负调控。探讨 miR-4784 功能发现, 过表达 miR-4784 可抑制 MDA-MB-231 细胞活力、克隆形成、迁移、侵袭, 抑制 N-cadherin 蛋白表达, 促进 E-cadherin 蛋白表

达,这与干扰circNEIL3表达的抗增殖、抗迁移和抗侵袭功能一致。由于干扰circNEIL3明显增加miR-478表达水平,提示circNEIL3对MDA-MB-231细胞生物行为的影响可能与调控miR-478表达有关。深入分析显示,抑制miR-478表达明显减弱干扰circNEIL3对MDA-MB-231细胞活力、克隆形成、迁移和侵袭的影响,这表明circNEIL3通过靶向负调控miR-478表达影响乳腺癌细胞生物学行为。然而,circNEIL3是否调控miR-478以外其他miRNA、miRNA下游的潜在靶点等问题需要在后续研究中进行探索。

综上所述,乳腺癌中circNEIL3呈高表达,miR-478呈低表达。干扰circNEIL3通过靶向上调miR-478表达可抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,这些发现为研究乳腺癌转移机制提供了新的思路,并为乳腺癌治疗提供了潜在靶点。

[参考文献]

- [1] KASHYAP D, PAL D, SHARMA R, *et al.* Global increase in breast cancer incidence: risk factors and preventive measures[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 9605439[2023-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35480139/>. DOI: 10.1155/2022/9605439.
- [2] BAUER A. Radiation treatment for breast cancer[J]. *Surg Clin N Am*, 2023, 103(1): 187-199. DOI: 10.1016/j.suc.2022.08.015.
- [3] ZHANG X, HUANG J M, WANG J Y, *et al.* circ_0001667 accelerates breast cancer proliferation and angiogenesis through regulating CXCL10 expression by sponging miR-6838-5p[J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(10): 881-892. DOI: 10.1111/1759-7714.14820.
- [4] TREECK O, HAERTEIS S, ORTMANN O. Non-coding RNAs modulating estrogen signaling and response to endocrine therapy in breast cancer[J/OL]. 2023, 15(6): 1632[2023-04-05]. <https://www.semanticscholar.org/paper/Non-Coding-RNAs-Modulating-Estrogen-Signaling-and-Treeck-Haerteis/72c90f14f9cef672c6945222cb464f1114688aa>. DOI: 10.3390/cancers15061632.
- [5] XIONG Y Y, LI L, WANG N, *et al.* circ_0001387 regulates SKA2 to accelerate breast cancer progression through miR-136-5p[J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(18): 1707-1718. DOI: 10.1111/1759-7714.14916.
- [6] LING Y, LIANG G H, LIN Q, *et al.* circCDYL2 promotes trastuzumab resistance via sustaining HER2 downstream signaling in breast cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 8[2023-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34980129/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01476-7.
- [7] CHEN Y, GENG Y T, HUANG J C, *et al.* circNEIL3 promotes cervical cancer cell proliferation by adsorbing miR-137 and upregulating KLF12[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 1-12. DOI: 10.1186/s12935-020-01736-4.
- [8] FENG Y, QU L Y, WANG X L, *et al.* LINC01133 promotes the progression of cervical cancer by sponging miR-4784 to up-regulate AHDC1[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(12): 1453-1461. DOI: 10.1080/15384047.2019.1647058.
- [9] YIN Y T, LONG J L, HE Q L, *et al.* Emerging roles of circRNA in formation and progression of cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(21): 5015-5021. DOI: 10.7150/jca.30828.
- [10] WEIDLE U H, HSIA H E, BRINKMANN U. Breast cancer: circular RNAs mediating efficacy in preclinical *in vivo* models[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2023, 20(3): 222-238. DOI: 10.21873/cgp.20377.
- [11] MISIR S, OZER YAMAN S, PETROVIĆ N, *et al.* circRNAs in drug resistance of breast cancer[J]. *Oncol Res*, 2022, 30(4): 157-172. DOI: 10.32604/or.2022.027547.
- [12] LIU Z H, ZHOU Y, LIANG G H, *et al.* circular RNA hsa_circ_001783 regulates breast cancer progression via sponging miR-200c-3p[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 55 [2023-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30670688/>. DOI: 10.1038/s41419-018-1287-1.
- [13] XU J Z, SHAO C C, WANG X J, *et al.* circTADA2a suppress breast cancer progression and metastasis via targeting miR-203a-3p/SOCS3 axis[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 175 [2023-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30787278/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1382-y.
- [14] LIU T, YE P, YE Y Y, *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. DOI: 10.1111/jcmm.14875.
- [15] LI Z J, ZHANG J P, JIANG Y Y, *et al.* Circular ribonucleic acid Nei-like deoxyribonucleic acid glycosylase 3 governs the microribonucleic acid-3150b-3p/laminin subunit gamma 1 network to partially promote the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2021, 51(6): 702-714. DOI: 10.1111/hepr.13636.
- [16] SHEN P, YANG T Y, CHEN Q, *et al.* circNEIL3 regulatory loop promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via miRNA sponging and A-to-I RNA-editing[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 51 [2023-04-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33750389/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01333-7.
- [17] ZHANG J, HU Z, HORTA C A, *et al.* Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor microenvironmental signals and its implication in cancer therapeutics[J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 88: 46-66. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.12.002.
- [18] ANG H L, MOHAN C D, SHANMUGAM M K, *et al.* Mechanism of epithelial-mesenchymal transition in cancer and its regulation by natural compounds[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(4): 1141-1200. DOI: 10.1002/med.21948.
- [19] LIU J, YU Q L, YE Y H, *et al.* Abnormal expression of miR-4784 in chondrocytes of osteoarthritis and associations with chondrocyte hyperplasia[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4690-4694. DOI: 10.3892/etm.2018.6739.
- [20] ZHENG S Y, GUO Y, DAI L Z, *et al.* Long intergenic noncoding RNA01134 accelerates hepatocellular carcinoma progression by sponging microRNA-4784 and downregulating structure specific recognition protein 1[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 1016-1026. DOI: 10.1080/21655979.2020.1818508.
- [21] GU H Z, LIN R R, ZHENG F Y, *et al.* ELK1 activated-long noncoding RNA LBX2-AS1 aggravates the progression of ovarian cancer through targeting miR-4784/KDM5C axis[J]. *J Mol Histol*, 2021, 52(1): 31-44. DOI: 10.1007/s10735-020-09921-5.

[收稿日期] 2023-04-07

[修回日期] 2023-08-01

[本文编辑] 郁晓路