

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.004

· 基础研究 ·

circRNA_001569 通过 miR-145/HBXIP 轴影响乳腺癌细胞的恶性生物学行为

董江萌¹, 王勇¹, 齐义新², 贾巍¹ (1. 衡水市人民医院 腺体血管外科, 河北 衡水 053000; 2. 河北医科大学 第四医院 肿瘤科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨 circRNA_001569 通过 miR-145/HBXIP 轴在乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移中发挥的作用。**方法:** 收集 2016 年 1 月至 2019 年 1 月期间衡水市人民医院收治的 30 例乳腺癌患者的癌组织和癌旁组织。qPCR 检测 circRNA_001569 在乳腺癌组织、癌旁组织以及细胞系中的表达。生物信息学工具预测 miR-145 的靶基因, RNA 免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 和双荧光素酶报告基因实验检测 miR-145 或靶基因之间的相互作用; 向乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中转染 si-circRNA_001569、miR-145 mimics 或 miR-145 inhibitor, 建立基因过表达或沉默的细胞模型, qPCR 和 Western blotting 分别检测转染对相关基因和蛋白表达的影响, CCK-8 法、Transwell 实验检测转染对细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**结果:** 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中, circRNA_001569 和 HBXIP 均呈高表达、miR-145 呈低表达。RIP 分析和双荧光素酶实验证实了 miR-145 与 circRNA_001569 和 HBXIP 之间的靶向关系; circRNA_001569 或 HBXIP 过表达促进 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的增殖、侵袭和迁移 (均 $P < 0.01$), 而 miR-145 过表达起相反的作用 (均 $P < 0.01$)。**结论:** circRNA_001569 可能通过下调 miR-145 的表达、上调 HBXIP 的表达从而促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

[关键词] 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; MCF-7 细胞; circRNA_001569; miR-145/HBXIP 轴; 增殖; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1220-09

circRNA_001569 affects the malignant biological behavior of breast cancer cells through the miR-145/HBXIP axis

DONG Jiangmeng¹, WANG Yong¹, QI Yixin², JIA Wei¹ (1. Department of Glandular Vascular Surgery, Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, Hebei, China; 2. Department of Oncology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of circRNA_001569 in the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells via miR-145/HBXIP axis. **Methods:** Collected 30 cases of cancerous tissue and 30 adjacent tissues of breast cancer patients treated in the Hengshui People's Hospital from January 2016 to January 2019. qPCR detects the expression of circRNA_001569 in breast cancer tissues, adjacent tissues and cell lines. Bioinformatics tools were used to predict the target genes of miR-145. RNA immunoprecipitation (RIP) and Dual luciferase reporter gene assay were used to detect the interaction between genes or proteins. si-circRNA_001569, miR-145 mimics or miR-145 inhibitor were transfected into breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells to establish gene overexpression or silence cell models. qPCR and Western blotting were used to detect the expressions of related genes and proteins. CCK-8 method and Transwell test were used to detect the proliferation, invasion and migration of transfected cells. **Results:** In breast cancer tissues and breast cancer cells, the expressions of circRNA_001569 and HBXIP were up-regulated, while the expression of miR-145 was down-regulated; RIP analysis and Dual luciferase analysis revealed the targeting relationship among miR-145, circRNA_001569 and HBXIP. Over-expression of circRNA_001569 or HBXIP promoted the proliferation, invasion and migration of MDA-MB-231 and MCF-7 cells (all $P < 0.01$), while miR-145 overexpression had the opposite effect (all $P < 0.01$). **Conclusion:** circRNA_001569 may promote the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by down-regulating the expression of miR-145 and up-regulating the expression of HBXIP.

[Key words] breast cancer; MDA-MB-231 cell; MCF-7 cell; circRNA_001569; miR-145/HBXIP axis; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1220-1228. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.004]

[基金项目] 河北省重点研发计划资助项目 (No.19277799D)。Project supported by the Key Research and Development Project of Hebei Province (No.19277799D)

[作者简介] 董江萌 (1986-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事乳腺肿瘤研究, E-mail: nextlife7@163.com

[通信作者] 贾巍 (JIA Wei, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事乳腺肿瘤研究, E-mail: hywkjw@126.com

乳腺癌(breast cancer, BC)是严重的恶性肿瘤,在女性中发病率最高,每年全球有130万以上的女性被诊断出患有BC,并且有50万以上女性死于BC^[1-2]。随着生活方式和生态环境的恶化,中国BC每年新增病例的占比高达3%~4%^[3]。因此,阐明BC的发病机制、控制BC的发病率及提高BC的治疗效果已成为亟待解决的主要问题^[4]。环状RNA(circRNA)是由共价键形成的闭合环状RNA,通常包括外显子序列,并在经典剪接位点剪接^[5-6]。circRNA可以充当miRNA海绵,调节剪接和转录并修饰亲本基因的表达^[7-8]。生物信息学数据库显示, circRNA_001569在乳腺癌组织中高表达。MicroRNA(miRNA)通过靶向相应的信使RNA引发基因改变^[9-10]。miR-145的异位表达被认为是许多疾病的重要因素,例如癌症和关节炎^[11-12]。因此,进一步了解miR-145在癌症的发生、发展中的作用至关重要。乙肝病毒X蛋白结合蛋白(hepatitis B virus X-interacting protein, HBXIP)是分子量为19 kD的蛋白,因其可与乙肝病毒X蛋白(hepatitis B virus X, HBX)的C端特异性结合而得名,HBXIP在脊椎动物中非常保守,是细胞组成型蛋白^[13]。HBXIP在肿瘤细胞的增殖、有丝分裂、中心体动态和细胞周期进展中发挥重要作用^[14-15]。研究^[16]发现,HBXIP作为癌蛋白具有促进乳腺癌细胞增殖和迁移的作用。但是,对HBXIP是否参与miR-145对乳腺癌发展的作用研究甚少。因此,本实验旨在研究circRNA_001569、miR-145和HBXIP在乳腺癌组织和乳腺癌细胞系中的表达、circRNA_001569、miR-145和HBXIP的相互关系及circRNA_001569/miR-145/HBXIP轴对乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系和主要试剂

收集2016年1月至2019年1月在衡水市人民医院接受乳腺癌切除手术患者的癌组织和癌旁组织标本,共纳入女性患者30例,年龄35~53岁,平均为(42.36±4.21)岁。纳入标准:(1)符合乳腺癌的诊断标准;(2)随访数据完整,病历资料完整,可供分析;(3)手术前未进行放、化疗。排除标准:(1)合并其他部位原发恶性肿瘤者;(2)临床资料不完整,无法完成临床分析者。所有患者均签署了知情同意书,本研究获得医院伦理委员会的审查、批准与监督。所有组织标本均保存在-80℃直至使用。

人正常乳腺上皮细胞系(MCF-10A)和5种人乳腺癌细胞系(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、T47D、BT20)均购自中国科学院上海细胞生物研究所。

RPMI 1640培养基、L15培养基、胎牛血清和CCK-8

试剂盒购自美国Gibco公司,TRIzol试剂、PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒、PrimeScript™ RT Reagen Kit试剂盒、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒和SYBR® Premix EX Taq™ II试剂盒均购自日本TaKaRa公司, MicroRNA Reverse Transcription试剂盒购自上海慧颖生物科技有限公司, miRNA阴性对照(NC)、miR-145 mimics、miR-145 inhibitor由Genepharma公司合成, si-NC、si-circRNA_001569和Lipofectamine™ 3000购自美国Invitrogen公司, Magna RIP RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒、pmirGLO载体、双荧光素酶活性检测试剂盒和8 μm孔径的Transwell小室均购自美国Promega公司, RIPA裂解液、BCA试剂盒、兔抗HBXIP抗体均购自美国Abcam公司, 兔抗β-actin抗体和山羊抗兔IgG抗购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 细胞培养及转染

MCF-10A、T47D、BT20、MDA-MB-468细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养, MDA-MB-231细胞用含10%胎牛血清的L-15培养基培养。细胞均置于37℃、5% CO₂的培养箱中, 每2 d更换一次培养基, 以保证细胞所需的营养成分。取对数期、状态良好的细胞进行后续实验。

按照Lipofectamine™ 3000转染试剂说明书将50 ng的si-NC和si-circRNA_001569及100 nmol/L的NC、miR-145 mimics、miR-145 inhibitor分别转入MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞中。在37℃、5% CO₂的培养箱中培养6 h后, 更换新鲜的培养基继续培养, 48 h后结束培养, 收集各组细胞进行后续实验。

1.3 qPCR检测

用TRIzol试剂提取组织样本或者细胞总RNA, 使用紫外分光光度计检测总RNA的纯度和含量, 并将每个配对的样品调节至相同浓度。使用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒将提取的circRNA逆转录成cDNA, 使用PrimeScript™ RT Reagen Kit试剂盒将提取的miRNA逆转录为cDNA, 使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒将提取的mRNA逆转录成cDNA。使用SYBR Premix EX Taq™试剂盒进行qPCR, 使用FTC-3000p qPCR系统完成实验后, 采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对表达量。引物序列见表1。

1.4 CCK-8法检测circRNA_001569和miR-145的表达对乳腺癌细胞增殖的影响

将MDA-MB-231、MCF-7细胞分别以2×10⁴个/孔接种到96孔板上, 待细胞生长汇合至60%时, 采用Lipofectamine™ 3000进行转染。培养24、48、72或96 h时, 将10 μl CCK-8溶液添加到每个孔中, 并在

37 °C 下孵育 2 h。最后,使用自动酶标仪检测各孔在 450 nm 波长下的光密度(*D*)值。实验重复 3 次。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Target	Primer sequence (5'-3')
circRNA_001569	F 5'-TCCCCTGAACATTCTCCCAT-3' R 5'-GAAAGCACTTGGTGAAGTCGG-3'
miR-145	F 5'-GTCCAGTTTCCCAGGAATCCCT-3' R 5'-CCCAGGAAUCCCU-3'
HBXIP	F 5'-GCCCTAGAGTCTCCTGAGCA-3' R 5'-GAGGGAGTTCTTCTTAGG-3'
U6	F 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' R 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
β-actin	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

1.5 Transwell 实验检测 circRNA_001569 和 miR-145 表达对乳腺癌细胞侵袭与迁移能力的影响

细胞侵袭能力检测:采用 Transwell 侵袭实验。收集各组转染 48 h 后的细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,细胞密度为 1×10^6 个/ml。将 Transwell 小室的上下室之间用包被了人工基底膜的聚碳酸酯微孔膜(孔径 8 μm)分隔,上室加入细胞悬液 100 μl ,下室加入含 10% FBS 的完全培养基 500 μl 。然后将 Transwell 小室置于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中孵育 8 h。取出聚碳酸酯微孔膜,用棉签轻轻擦去基底膜和上表面的细胞,然后以中性甲醛固定,苏木精染色。显微镜下随机选取 5 个视野,计数穿膜细胞数。以穿膜细胞数代表细胞侵袭能力,实验重复 3 次,取平均值。

细胞迁移能力检测:采用 Transwell 迁移实验。方法同上,但聚碳酸酯微孔膜不包被人工基底膜。实验重复 3 次,取平均值。

1.6 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-145 与 circRNA_001569 和 HBXIP 基因之间的靶向关系

通过 TargetScan 数据库 (<http://www.TargetScan.org>) 分析 miR-145 的靶基因。将预测得到包含 miR-145 结合位点的 circRNA_001569 3'UTR 或 HBXIP 3'UTR 片段插入 pmirGLO, 得到野生型 circRNA_001569 3'UTR 和 HBXIP 3'UTR 的报告基因载体 circRNA_001569 3'UTR WT 和 HBXIP 3'UTR WT。将靶序列进行突变,得到突变型载体 circRNA_001569 3'UTR MUT 和 HBXIP 3'UTR MUT。分别将 circRNA_001569 3'UTR WT、HBXIP 3'UTR WT、circRNA_001569 3'UTR MUT 或 HBXIP 3'UTR MUT 与 miR-145 mimics 或 NC 共转染至 MDA-MB-231 细胞或 MCF-7 细胞中。48 h 后,应用双荧光素酶活性

检测试剂盒测定 MDA-MB-231 细胞或 MCF-7 细胞的荧光素酶活性。载体构建图见图 1。

1.7 RIP 实验检测 AGO2 抗体对 circRNA_001569 的富集作用

使用 Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒进行 RIP 实验。分别取 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞约 1×10^7 个,用 RIP 裂解缓冲液加蛋白酶和 RNase 抑制剂重悬。将 100 ml 细胞裂解物分别与 5 mg 对照组 IgG 或 AGO2 抗体包被的 beads 在 4 °C 下旋转过夜孵育。用蛋白酶 K 处理后,通过 RNeasy Min Elute Cleanup Kit 提取免疫沉淀的 RNA 并使用 Prime Script RT Master Mix 进行逆转录反应。通过 qRT-PCR 测定检测 circRNA_001569 的丰度。

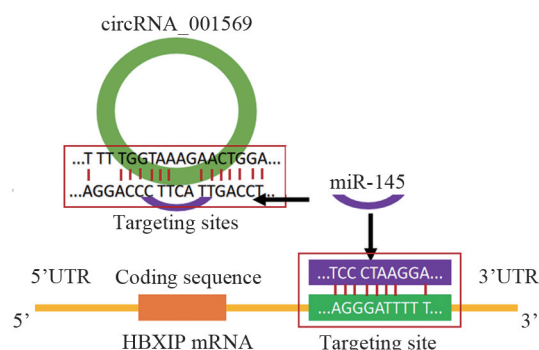


图 1 载体构建图

Fig.1 Vector construction diagram

1.8 Western blotting 检测

转染 48 h 后的各组细胞用 RIPA 裂解并提取总蛋白,通过 BCA 方法进行定量,样品经变性后进行上样,按照实验步骤进行电泳-转膜-封闭(5%脱脂奶粉)—抗孵育[兔抗 HBXIP 抗体(1:2 000)、兔抗 β -actin 抗体(1:2 000),4 °C 过夜]-二抗孵育[山羊抗兔 IgG 抗体(1:1 000),室温 1 h]-显影曝光。Image-Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。实验重复 3 次,取平均值。

1.9 统计学处理

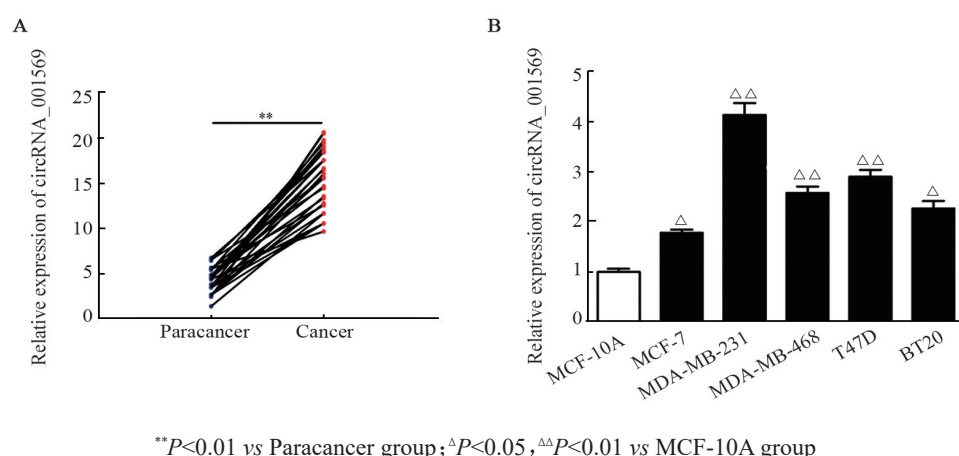
统计学分析采用 SPSS 19.0 软件,至少取 3 次独立实验结果,正态分布的计量数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 *LSD-t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circRNA_001569 在乳腺癌组织和细胞中高表达 qPCR 检测结果(图 2)显示,与癌旁组织相比, circRNA_001569 在乳腺癌组织中表达上调($P < 0.01$; 图 2A);与 MCF-10A 细胞相比,在 5 个乳腺癌细胞系

中均观察到 circRNA_001569 高表达, 其中, MDA-MB-231 细胞中 circRNA_001569 表达最高 ($P<0.01$),

而 MCF-7 细胞中 circRNA_001569 表达最低 ($P<0.05$, 图 2B)。



A: circRNA_001569 was up-regulated in tumor tissue samples; B: circRNA_001569 was upregulated in breast cancer cell lines

图2 circRNA_001569 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中高表达

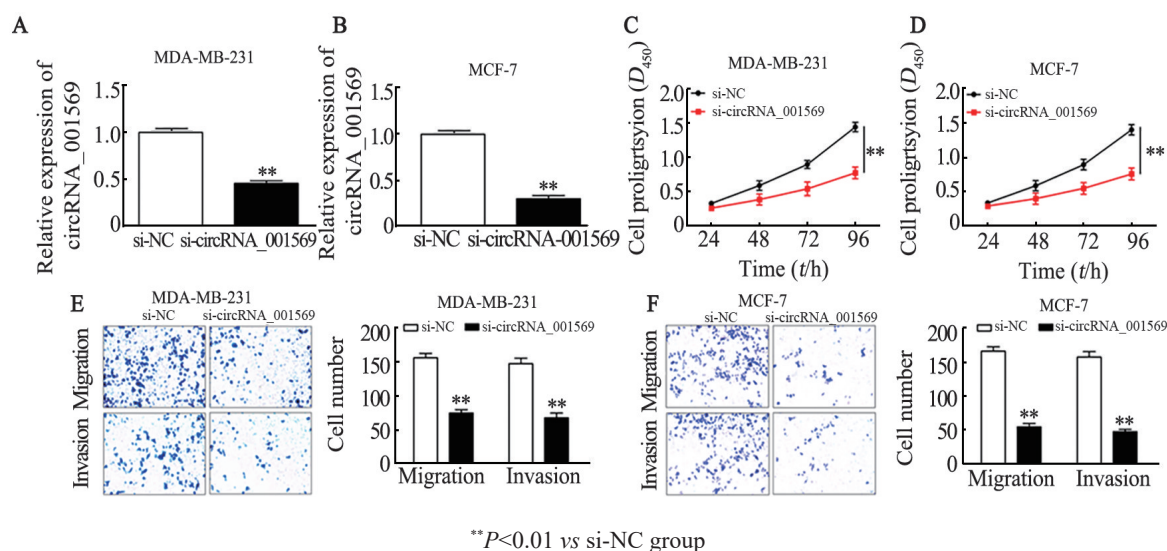
Fig.2 CircRNA_001569 was highly expressed in breast cancer tissues and breast cancer cells

2.2 敲降 circRNA_001569 抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

qPCR 检测结果(图 3A、B)显示, si-circRNA_001569 转染 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞后均显著下调了细胞中 circRNA_001569 的表达 (均 $P<0.01$)。

从功能上看, CCK-8 检测结果 (图 3C、D) 显示,

转染 si-circRNA_001569 明显抑制了 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞的增殖 (均 $P<0.01$)。Transwell 细胞侵袭与迁移实验结果 (图 3E、F) 表明, 转染 si-circRNA_001569 明显减弱 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞的侵袭与迁移能力 (均 $P<0.01$)。



** $P<0.01$ vs si-NC group

A, B: si-circRNA_001569 significantly reduced the expression of circRNA_001569 in MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells;

C, D: si-circRNA_001569 significantly reduced the proliferation of MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells;

E, F: si-circRNA_001569 reduced the invasion and migration capacity of MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells ($\times 100$)

图3 circRNA_001569 促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

Fig.3 circRNA_001569 promoted the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells

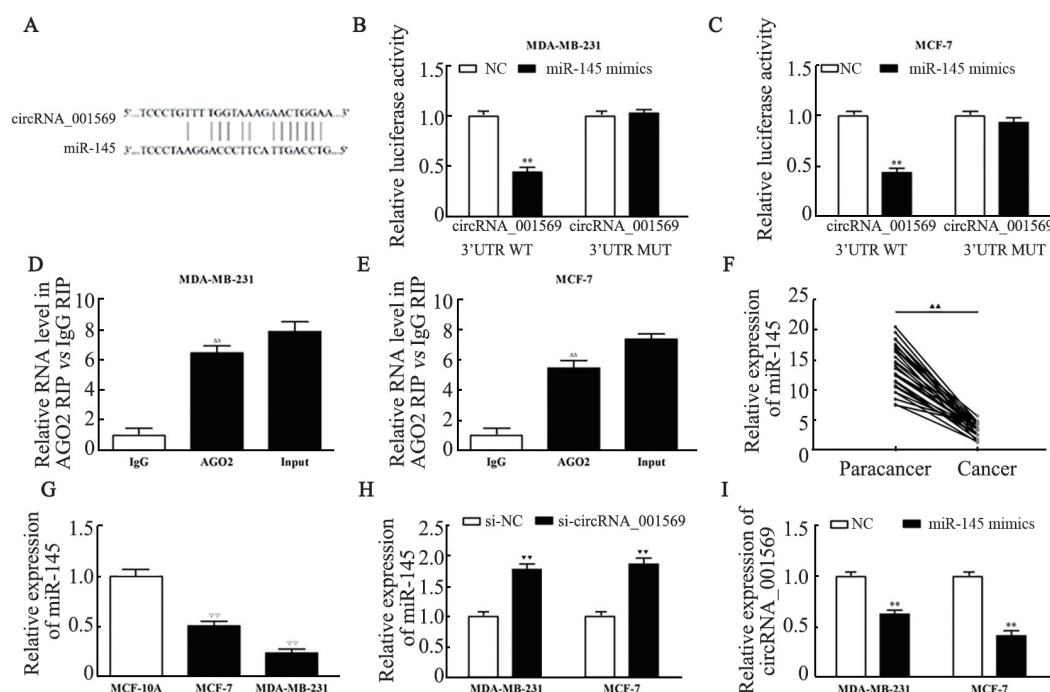
2.3 circRNA_001569 是 miR-145 的分子海绵

为了探索乳腺癌细胞中 miR-145 与 circRNA_001569 的潜在关系, 借助生物信息学工具进行预测, 结果 (图

4A) 显示 miR-145 可能是 circRNA_001569 的候选靶基因。双荧光素酶报告基因检测结果 (图 4B、C) 表明, 在 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中, miR-145

mimics 显著抑制了携带 circRNA_001569 3'UTR WT 质粒的荧光素酶活性(均 $P < 0.01$), 但当报告质粒携带 circRNA_001569 3'UTR MUT 时未观察到明显的抑制作用。RIP 实验检测结果(图 4D、E)表明, 相较于 IgG 抗体, AGO2 抗体能明显富集 circRNA_001569 (均 $P < 0.01$)。qPCR 检测结果表明, miR-145 在乳腺癌组织和 MDA-MB-231 细胞、MCF-7 细胞中的表达明显下调(均 $P < 0.01$, 图 4F、G), 而敲降 circRNA_

001569 后 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中 miR-145 表达水平显著升高(均 $P < 0.01$, 图 4H); 同时, MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中的 miR-145 过表达后, circRNA_001569 表达显著降低(均 $P < 0.01$, 图 4I)。综上所述, circRNA_001569 可以直接与乳腺癌细胞中的 miR-145 结合, 且两者具有相互抑制的作用。



** $P < 0.01$ vs NC group, $\Delta P < 0.01$ vs IgG group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Paracancer group, $\nabla P < 0.01$ vs MCF-10A group, $\nabla\nabla P < 0.01$ vs si-NC group
A: Binding site between miR-145 and circRNA_001569; B, C: Dual luciferase reporter assay showed that miR-145 could negatively regulate luciferase activity of circRNA_001569 3'UTR WT, not circRNA_001569 3'UTR MUT; D, E: RIP experiments showed that in MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells, the degree of circRNA_001569 enrichment between AGO2 and IgG was significantly different; F: qPCR analysis showed that miR-145 expression was down-regulated in breast cancer tissue samples compared to paracancer tissue; G: qPCR detected that miR-145 was down-regulated in MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells; H: qPCR showed that circRNA_001569 could negatively regulate the expression of miR-145 in breast cancer cells; I: qPCR showed that miR-145 could negatively regulate the expression of circRNA_001569 in breast cancer cells

图4 miR-145与circRNA_001569的关系以及它们在乳腺癌组织和细胞中的表达

Fig.4 The relationship between miR-145 and circRNA_001569 and their expression in breast cancer tissues and cells

2.4 miR-145抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭与迁移

CCK-8 检测结果(图 5A、B)表明, 与对照组相比, 过表达 miR-145 显著抑制了 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞的增殖(均 $P < 0.01$)。细胞侵袭与迁移实验结果(图 5C、D)表明, 与对照组相比, 过表达 miR-145 显著减少了 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞的侵袭与迁移细胞数(均 $P < 0.01$)。

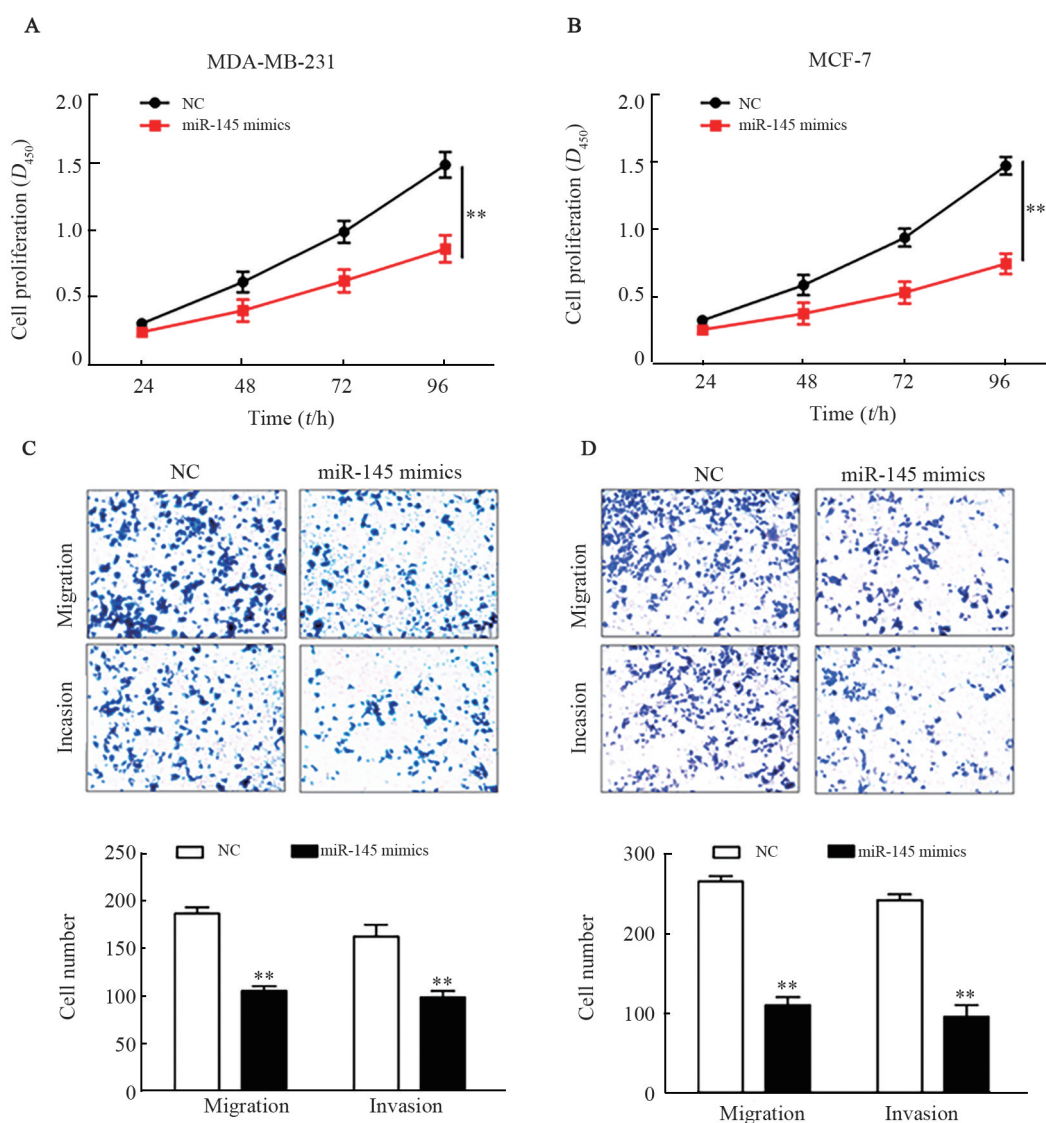
2.5 HBXIP 与 miR-145、circRNA_001569 之间的相互关系

为了探索乳腺癌细胞中 HBXIP 基因与 miR-145 的潜在关系, 借助生物信息学工具预测 HBXIP

mRNA 可能是 miR-145 的候选目标, 如图 6A 所示。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 6B、C)表明, miR-145 mimics 明显抑制了携带 HBXIP 3'UTR WT 的荧光素酶活性, 但当报告质粒携带 HBXIP 3'UTR MUT 时未观察到明显的抑制作用(均 $P < 0.01$)。qPCR 检测结果(图 6D)显示, HBXIP mRNA 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中呈高表达(均 $P < 0.01$)。Western blotting 检测结果(图 6F、G)表明, miR-145 过表达可负调控 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中 HBXIP 的表达(均 $P < 0.01$), circRNA_001569 过表达可以正调控 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中 HBXIP

的表达(均 $P < 0.01$)。因此推测, HBXIP 是 miR-145 的直接靶标, 受到 miR-145 的负调控, 并且受到

circRNA_001569 的正调控。



** $P < 0.01$ vs NC group

A, B: miR-145 mimics significantly reduced the proliferation capacity of MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells detected by CCK-8 assay;

C, D: miR-145 mimics reduced the invasion and migration capacity of MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells detected by

Transwell assay ($\times 100$)

图5 miR-145抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

Fig.5 miR-145 inhibited the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells

2.6 circRNA_001569/miR-145/HBXIP 轴影响乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

qPCR 检测结果(图 7A)显示,在MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中,与 si-circRNA_001569+NC 组相比, si-circRNA_001569+miR-145 inhibitor 组 HBXIP 的表达显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。CCK-8 检测结果(图 7C、D)显示,与 si-circRNA_001569+NC 组相比, si-circRNA_001569+miR-145 inhibitor 组 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的增殖水平显著升高(均 $P < 0.01$)。Transwell 实验检测结果(图 7E、F)显示,与 si-circRNA_001569+NC 组相比, si-circRNA_

001569+miR-145 inhibitor 组 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的侵袭、迁移细胞数均显著增加(均 $P < 0.01$)。

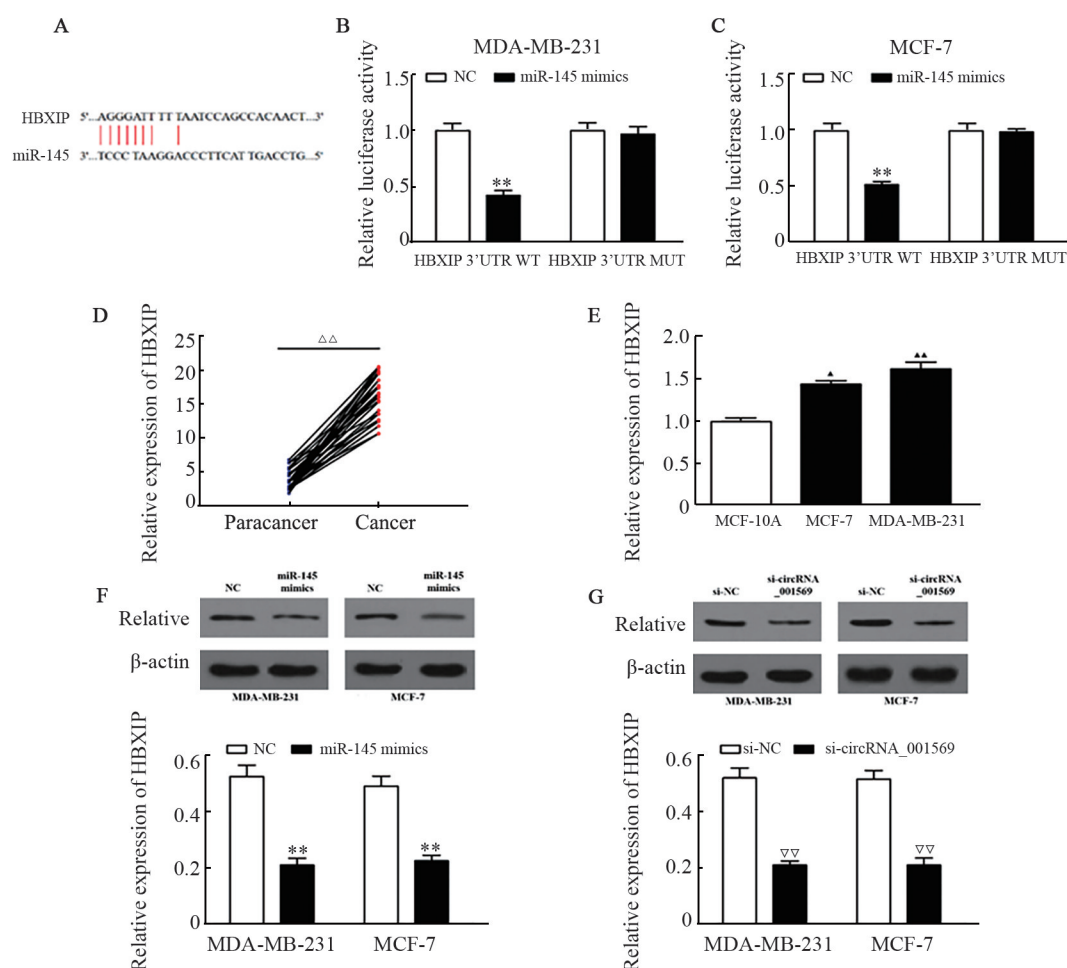
3 讨论

BC 是全世界女性人群中与癌症相关的死亡的主要原因^[17], 是美国女性中最常见的癌症(皮肤癌除外), 是仅次于肺癌的女性癌症死亡的第二大原因^[18]。因此, 阐明与 BC 发生发展相关的机制并为 BC 治疗找到有希望的治疗靶点至关重要。

circRNA 是一种新型的内源性 RNA, 在真核转录组中高度表达。与 lncRNA 和 miRNA 相比, circRNA

具有共价闭合的连续环,而不是5'-3'极性和聚腺苷酸化的尾巴^[19]。由于这种特殊的稳定结构,circRNA可以参与各种生物学功能,从而提高生物学稳定性。研究发现,circRNA_001569在胃癌^[20]、结直肠癌^[21]中具有促癌作用,然而在乳腺癌中研究甚少。本研究

发现,circRNA_001569在乳腺癌组织和细胞中高表达,且敲降circRNA_001569可抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移。因此,circRNA_001569有可能作为一类新型的潜在生物标志物或癌症的治疗靶标。



** $P < 0.01$ vs NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Paracancer group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs MCF-10A group; $\nabla\nabla P < 0.01$ vs si-NC group

A: Binding site between HBXIP and miR-145; B, C: Dual luciferase reporter assay showed that in MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells, miR-145 negatively regulated the luciferase activity of HBXIP 3'UTR WT, not HBXIP 3'UTR MUT; D: HBXIP expression was up-regulated in breast cancer tissue samples; E: HBXIP was up-regulated in breast cancer MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells;

F: miR-145 negatively regulated the expression of HBXIP in breast cancer cells; G: circRNA_001569 positively regulated the expression of HBXIP in breast cancer cells

图6 HBXIP与miR-145、circRNA_001569的关系以及在乳腺癌组织和细胞中的表达

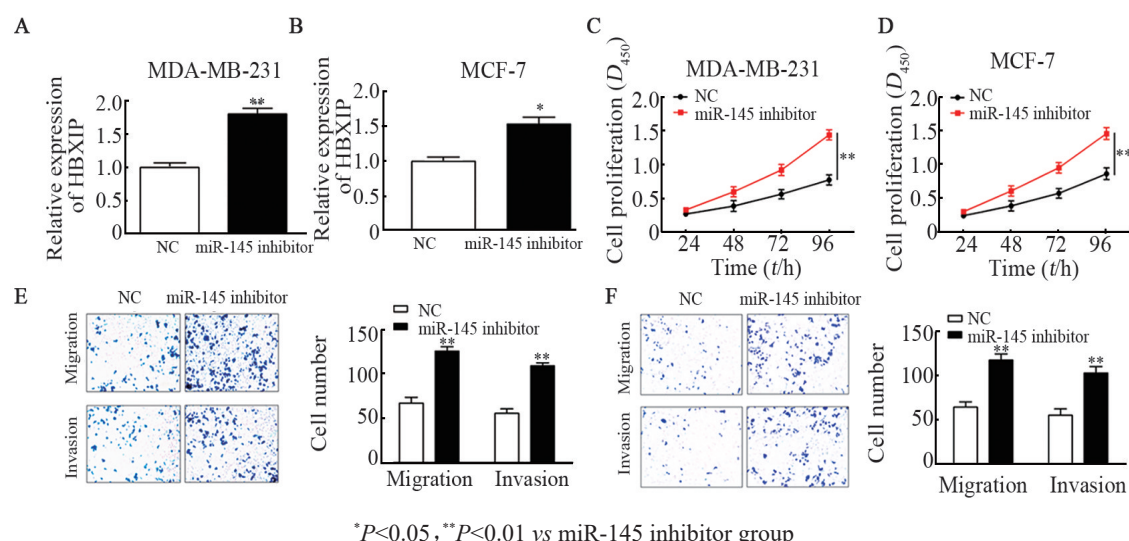
Fig.6 Relationship between HBXIP and miR-145, circRNA_001569 and their expression in breast cancer tissues and cells

miRNAs构成了一类小的单链非编码RNA,它们在转录后调节靶mRNA的表达。数以千计的miRNAs被认为参与了与代谢、信号转导、细胞黏附、细胞运动、细胞分化和凋亡^[22]。因此,对于不同的靶基因和癌症类型,已发现miRNAs既可作为癌基因又可作为肿瘤抑制因子^[23]。目前,研究发现miR-145与多种癌症的进展有关。LEI等^[24]发现miR-145通过抑制MYO6抑制胃癌细胞的迁移和转移;WANG等^[25]发现miR-145通过靶向ADAM19改变非小细胞肺癌

细胞对吉非替尼的敏感性。本研究发现,miR-145在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中低表达,过表达miR-145可抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭迁移,促进乳腺癌细胞凋亡。此外,借助生物信息学工具预测circRNA_001569与miR-145的结合位点,双荧光素酶报告基因检测进一步证实了circRNA_001569与miR-145的靶向关系。同时发现,circRNA_001569与miR-145的表达呈负相关。研究^[26-27]表明,HBXIP在细胞增殖和迁移中起促癌作用。本研究发现,HBXIP在乳腺癌

组织和乳腺癌细胞中高表达, 过表达 HBXIP 促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移。利用生物信息学工具预测 miR-145 与 HBXIP 的结合位点, 双荧光素酶报

告基因检测进一步证实了 miR-145 与 HBXIP 的靶向关系, 同时发现 miR-145 与 HBXIP 的表达呈负相关。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-145 inhibitor group

A, B: miR-145 could reverse the effect of circRNA_001569 on HBXIP expression in MDA-MB-231 cells and MCF cells;

C, D: miR-145 could reverse the effect of circRNA_001569 on proliferation ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells;

E F: miR-145 could reverse the effect of circRNA_001569 on invasion and migration ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells ($\times 100$)

图7 circRNA_001569/miR-145/HBXIP 轴促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

Fig.7 The circRNA_001569/miR-145/HBXIP axis promoted the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells

综上, miR-145 靶向负调控 circRNA_001569 和 HBXIP, circRNA_001569/miR-145/HBXIP 轴能促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 它们可能是乳腺癌治疗潜在的靶点。

参考文献

- [1] AKRAM M, IQBAL M, DANIYAL M, et al. Awareness and current knowledge of breast cancer[J]. Biol Res, 2017, 50(1): 33. DOI: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- [2] COUTIÑO-ESCAMILLA L, PIÑA-POZAS M, TOBIÁS GARC-ES A, et al. Non-pharmacological therapies for depressive symptoms in breast cancer patients: Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. Breast, 2019, 44: 135-143. DOI: 10.1016/j.breast.2019.01.006.
- [3] LI T, MELLO-THOMS C, BRENNAN P C. Descriptive epidemiology of breast cancer in China: incidence, mortality, survival and prevalence [J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 159(3): 395-406. DOI: 10.1007/s10549-016-3947-0.
- [4] GANDHI N, DAS G. Metabolic reprogramming in breast cancer and its therapeutic implications[J]. Cells, 2019, 8(2): 89. DOI: 10.3390/cells8020089.
- [5] ZHOU L H, YANG Y C, ZHANG R Y, et al. CircRNA_0023642 promotes migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(8): 2297-2303. DOI: 10.26355/eurrev_201804_14818.
- [6] HOLDT L M, KOHLMAIER A, TEUPSER D. Circular RNAs as therapeutic agents and targets[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1262. DOI: 10.3389/fphys.2018.01262.

- [7] CHEN F, FENG Z, ZHU J, et al. Emerging roles of circRNA_NEK6 targeting miR-370-3p in the proliferation and invasion of thyroid cancer via Wnt signaling pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19 (12): 1139-1152. DOI: 10.1080/15384047.2018.1480888.
- [8] LI M S, LIU Y L, ZHANG X L, et al. Transcriptomic analysis of high-throughput sequencing about circRNA, lncRNA and mRNA in bladder cancer[J]. Gene, 2018, 677: 189-197. DOI: 10.1016/j.gene.2018.07.041.
- [9] BAEK D, LEE K M, PARK K W, et al. Inhibition of miR-449a promotes cartilage regeneration and prevents progression of osteoarthritis in in vivo rat models[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 13: 322-333. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.09.015.
- [10] YANG X, QU X, MENG X, et al. MiR-490-3p inhibits osteogenic differentiation in thoracic ligamentum flavum cells by targeting FOXO1[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(11): 1457-1465. DOI: 10.7150/ijbs.26686.
- [11] LI J, ZHANG S L, ZOU Y L, et al. miR-145 promotes miR-133b expression through c-myc and DNMT3A-mediated methylation in ovarian cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4291-4301. DOI: 10.1002/jcp.29306.
- [12] HONG B K, YOU S, YOO S A, et al. MicroRNA-143 and-145 modulate the phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(8): e363. DOI: 10.1038/emmm.2017.108.
- [13] ZOU W, MA X, YANG H, et al. Hepatitis B X-interacting protein promotes cisplatin resistance and regulates CD147 via Sp1 in ovarian cancer[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242(5): 497-504. DOI: 10.1177/1535370216685007.
- [14] FUJII R, ZHU C, WEN Y, et al. HBXIP, cellular target of hepatitis B virus oncoprotein, is a regulator of centrosome dynamics and

- cytokinesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9099-9107. DOI:10.1158/0008-5472.can-06-1886.
- [15] BAR-PELED L, SCHWEITZER L D, ZONCU R, et al. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1196-1208. DOI: 10.1016/j.cell.2012.07.032.
- [16] LI Y, ZHANG Z, ZHOU X, et al. The oncoprotein HBXIP enhances migration of breast cancer cells through increasing filopodia formation involving MEK2/ERK1/2/Capn4 signaling[J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2): 288-296. DOI:10.1016/j.canlet.2014.09.047.
- [17] FU D Y, TAN H S, WEI J L, et al. Decreased expression of SOX17 is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(10): 8025-8034. DOI: 10.1007/s13277-015-3547-3.
- [18] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(6): 438-451. DOI: 10.3322/caac.21583.
- [19] 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.
- [20] SHEN F, LIU P, XU Z, et al. CircRNA_001569 promotes cell proliferation through absorbing miR-145 in gastric cancer[J]. *J Biochem*, 2019, 165(1): 27-36. DOI:10.1093/jb/mvy079.
- [21] XIE H, REN X, XIN S, et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 26680-26691. DOI: 10.18632/oncotarget.8589.
- [22] LI Z H, XIONG Q Y, XU L, et al. miR-29a regulated ER-positive breast cancer cell growth and invasion and is involved in the insulin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32566-32575. DOI: 10.18632/oncotarget.15928.
- [23] RYAN B M, ROBLES A I, HARRIS C C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6): 389-402. DOI:10.1038/nrc2867.
- [24] LEI C, DU F, SUN L, et al. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3101. DOI:10.1038/cddis.2017.493.
- [25] WANG Y, LIAN Y M, GE C Y. miR-145 changes sensitivity of non-small cell lung cancer to gefitinib through targeting ADAM19[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (13): 5831-5839. DOI: 10.26355/eurev_201907_18323.
- [26] LIU S, LI L, ZHANG Y, et al. The oncoprotein HBXIP uses two pathways to up-regulate S100A4 in promotion of growth and migration of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30228-30239. DOI:10.1074/jbc.m112.343947.
- [27] XU F Q, YOU X N, LIU F B, et al. The oncoprotein HBXIP up-regulates Skp2 via activating transcription factor E2F1 to promote proliferation of breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 333(1): 124-132. DOI:10.1016/j.canlet.2013.01.029.

[收稿日期] 2020-05-22

[修回日期] 2020-10-13

[本文编辑] 黄静怡