

Circ_0007444通过miR-6838-5p/CEP55轴促进MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和迁移

叶雨 张佳雯 诸健琴 华晶雯 孙晓春*
(江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 该研究旨在阐明circ_0007444调控乳腺癌进展的分子机制, 为乳腺癌的临床诊断、治疗和预后提供新的方向。通过生物信息学分析筛选出乳腺癌组织中差异表达的circRNAs。利用Sanger测序、RNase R实验和琼脂糖凝胶电泳法验证circ_0007444的环形结构。通过实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)检测乳腺癌组织及其匹配的邻近正常组织、正常乳腺上皮细胞MCF-10A和乳腺癌细胞系(MDA-MB-231和MCF-7)中circ_0007444的表达水平。通过RNA FISH实验对MDA-MB-231和MCF-7细胞中circ_0007444进行定位。采用平板克隆形成实验及Transwell实验评估转染si-circ_0007444后对细胞增殖和迁移能力的影响。通过Starbase、CircBank和Circular RNA Interactome三个公共数据库预测筛选circ_0007444所靶向的miRNAs。利用双荧光素酶报告系统验证circ_0007444与miR-6838-5p的靶向互作关系, 并通过平板克隆形成实验及Transwell实验探究si-circ_0007444和miR-6838-5p inhibitor共转染对乳腺癌细胞增殖和迁移能力的影响。通过数据库(Starbase、miRWalk、miRTarBase、GEPIA)预测miR-6838-5p调控的下游靶基因并取交集。RT-qPCR、蛋白质印迹法检测下游靶蛋白中心体蛋白55(centrosomal protein 55, CEP55)在MCF-10A、MDA-MB-231和MCF-7中的表达水平。通过RT-qPCR和蛋白质印迹法验证敲低和过表达miR-6838-5p后CEP55的mRNA和蛋白质表达水平。通过平板克隆形成实验及Transwell实验探究OE-CEP55和si-circ_0007444共转染对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响。结果表明circ_0007444在乳腺癌细胞中显著高表达($P < 0.001$)。细胞功能实验证实敲低circ_0007444可抑制细胞增殖活性和迁移能力。机制研究表明circ_0007444通过海绵化miR-6838-5p上调CEP55, 进而促进乳腺癌进展。总之, 该研究首次阐明circ_0007444/miR-6838-5p/CEP55调控轴在乳腺癌进展中的作用模式, 为开发基于环状RNA的分子靶向治疗提供了实验依据。

关键词 circ_0007444; miR-6838-5p; CEP55; 增殖; 迁移

Circ_0007444 Promotes the Proliferation and Migration of MDA-MB-231 and MCF-7 Cells via the miR-6838-5p/CEP55 Axis

YE Yu, ZHANG Jiaowen, ZHU Jianqin, HUA Jingwen, SUN Xiaochun*
(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract This study aims to clarify the molecular mechanism by which circ_0007444 regulates the progression of breast cancer, providing new directions for the clinical diagnosis, treatment and prognosis of breast cancer. Through bioinformatics analysis, differentially expressed circRNAs in breast cancer tissues were screened. The circular structure of circ_0007444 was verified by Sanger sequencing, RNase R experiment and agarose gel electro-

收稿日期: 2025-03-13

接受日期: 2025-04-30

*通信作者。Tel: 13605288200, E-mail: xiaochun@ujs.edu.cn

Received: March 13, 2025

Accepted: April 30, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13605288200, E-mail: xiaochun@ujs.edu.cn

phoresis. The expression level of circ_0007444 in breast cancer tissues and their matched adjacent normal tissues, normal breast epithelial cells MCF-10A and breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) was detected by RT-qPCR (real-time fluorescence quantitative PCR). The localization of circ_0007444 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells was determined by RNA FISH experiment. The effects of transfection of si-circ_0007444 on cell proliferation and migration ability were evaluated by plate clone formation assay and Transwell assay. Three public databases (Starbase, CircBank and Circular RNA Interactome) were used to predict and screen the miRNAs targeted by circ_0007444. The targeting interaction between circ_0007444 and miR-6838-5p was verified by dual-luciferase reporter system, and the effects of co-transfection of si-circ_0007444 and miR-6838-5p inhibitor on the proliferation and migration ability of breast cancer cells were explored by plate clone formation assay and Transwell assay. The downstream target genes regulated by miR-6838-5p were predicted by databases (Starbase, miRWalk, miRTarBase, GEPIA) and the intersection was taken. The expression levels of the downstream target CEP55 (centrosomal protein 55) in MCF-10A, MDA-MB-231 and MCF-7 were detected by RT-qPCR and Western blot. The mRNA and protein expression levels of CEP55 after knockdown and overexpression of miR-6838-5p were verified by RT-qPCR and Western blot. The effects of co-transfection of OE-CEP55 and si-circ_0007444 on the proliferation and migration of breast cancer cells were explored by plate clone formation assay and Transwell assay. The results showed that circ_0007444 was significantly highly expressed in breast cancer cells. Cell function experiments confirmed that knockdown of circ_0007444 could inhibit cell proliferation activity and migration ability. Mechanism studies showed that circ_0007444 promoted breast cancer progression by sponging miR-6838-5p and up-regulating CEP55. In conclusion, this study first clarified the regulatory mode of the circ_0007444/miR-6838-5p/CEP55 axis in breast cancer progression, providing experimental evidence for the development of circular RNA-based molecular targeted therapy.

Keywords circ_0007444; miR-6838-5p; CEP55; proliferation; migration

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是常见的女性恶性肿瘤, 其发病率在女性肿瘤疾病中居全球首位, 同时还是女性癌症死亡的主要原因, 严重威胁全球女性的生命^[1]。最新流行病学调查显示, 到2040年, 全球BC新发病例预计将超过300万例^[2]。BC是一种多因素共同作用的疾病, 发病机制复杂, 包括肿瘤相关的信号通路异常、癌基因异常激活或抑癌基因失活、免疫微环境异常等^[3-4]。近年来新兴的检测技术及诊疗方式加速了BC研究领域的发展, 探索BC新的有效生物学靶点和其调节机制仍是目前研究的焦点和难点。

环状RNA(circular RNAs, circRNAs)是一类新型的具有调节功能的内源性非编码RNA, 在哺乳动物细胞核和线粒体基因组中通过前体mRNA的反向剪接或非线性剪接反应产生^[5]。CircRNAs被发现可以通过多元分子机制参与基因表达的调控, 进而影响细胞增殖、分化和凋亡, 介导细胞免疫反应, 并在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[6]。CircRNAs主要作用模式包括竞争性结合miRNAs, 充当miRNAs“海绵”抑制miRNAs与靶标mRNAs的相互作用。例如,

circFKBP8通过竞争性结合miR-432-5p调控E2F7的表达, 影响BC细胞增殖、迁移和侵袭^[7]。RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)对于转录后的调控至关重要, 包括mRNA剪切、稳定、定位、修饰和翻译。CircRNAs可以通过与RBP相互作用参与蛋白功能调控。例如, circATP5C1通过与IGF2BP2结合以增加CSF-1的分泌来加速TNBC的进展, 从而揭示circATP5C1/IGF2BP2/CSF-1通路调控TNBC进展的新机制^[8]。部分circRNAs可以直接编码蛋白质产物, 并在各种恶性肿瘤的发生和发展中通过不同的机制发挥重要的生物学功能。例如, circ_SEMA4B及其新编码的蛋白SEMA4B-211aa在BC组织中显著下调, 并在体内和体外发挥肿瘤抑制作用^[9]。

在BC研究领域, circRNAs的异常表达已被证实与肿瘤发生发展的多维度进程密切相关。其分子调控网络涉及代谢重编程、免疫微环境调控、血管新生过程、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及细胞周期调控等关键通路, 这些发现揭示了其作为诊断和治疗标志物的应用潜力。

例如, circ_0022382在BC中高表达,且可以作为let-7a-5p的竞争性内源RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)调控PI3K/AKT/mTOR轴并提高BC细胞的增殖和迁移能力^[10]。Hsa_circ_0025202通过调控miR-182-5p/FOXO3a轴降低BC细胞对他莫昔芬治疗的敏感性^[11]。BC细胞来源外泌体circ_0001955通过海绵miR-708-5p上调PGK1促进细胞增殖和糖酵解,并增强紫杉醇对BC细胞的杀伤作用^[12]。

尽管已鉴定出数千种circRNAs,但仅有少数的生物学作用得到探索,其与蛋白质及miRNAs的互作网络仍待阐明。本文通过生物信息学分析筛选出BC组织中新发现的高表达的circRNA circ_0007444,通过敲低circ_0007444探究其对BC细胞系MDA-MB-231和MCF-7增殖和迁移的影响;进一步通过数据库筛选出circ_0007444与miR-6838-5p存在结合位点, circ_0007444通过直接结合miR-6838-5p发挥ceRNA功能,从而调控BC细胞增殖和迁移过程;最后通过数据库筛选出miR-6838-5p可以靶向调节中心体蛋白55(centrosomal protein 55, CEP55)的表达, circ_0007444通过miR-6838-5p/CEP55轴对BC细胞增殖和迁移产生影响。

1 材料与方法

1.1 组织、细胞和主要实验试剂

BC组织及其匹配的邻近正常组织由江苏大学附属江滨医院甲乳外科提供,患者均签署知情同意书且实验通过江苏大学伦理委员会批准;人乳腺癌细胞系(三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、雌激素受体阳性细胞MCF-7)、正常乳腺上皮细胞系(MCF-10A)、293T细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心;胎牛血清、DMEM高糖培养基购自德国Viva Cell公司;MCF-10A细胞专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; circ_0007444的干扰序列(si-circ_0007444#1和si-circ_0007444#2)和阴性对照序列(si-NC)、miR-6838-5p的过表达序列(miR-6838-5p mimic)和阴性对照序列(miR-6838-5p mimic-NC)、miR-6838-5p的抑制序列(miR-6838-5p inhibitor)和阴性对照序列(miR-6838-5p inhibitor-NC)、CEP55的干扰序列(si-CEP55)和过表达质粒(OE-CEP55)、RNA FISH试剂盒和circ_0007444探针购自苏州吉玛基因股份有限公司; Lipofectamine 2000试剂购自Invitrogen公司;细胞RNA提取试剂盒购自无锡

迈德泰克生物医药有限公司;定量引物购自上海生工生物工程股份有限公司;miRNA逆转录试剂盒、miRNA定量试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;RNase R、核酸染料、6×DNA上样缓冲液购自上海翌圣生物科技有限公司;0.25%胰酶细胞消化液、彩色预染蛋白Marker、琼脂糖粉末、1×TBST缓冲液、4%多聚甲醛购自北京兰杰柯科技有限公司;DNA Marker购自镇江爱必梦生物科技有限公司;溴化乙锭染液、TBE缓冲液购自上海爱必信生物科技有限公司;RIPA裂解液、PMSF购自北京雷根生物技术有限公司;结晶紫染液购自北京索莱宝生物科技有限公司;Transwell小室购自Corning公司;逆转录试剂盒、PCR试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、超敏ECL化学发光底物试剂盒、双荧光素酶试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;5×蛋白上样缓冲液、一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;PVDF膜购自德国Merck公司;HRP偶联的抗 β -actin购自Santa Cruz公司;CEP55抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;HRP标记的羊抗兔IgG(二抗)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 于GEO数据库筛选出BC相关的circRNAs数据集GSE182471。通过RStudio软件对数据集GSE182471进行差异分析。设置阈值 $|\log_2(\text{fold change, FC})| > 2$ 、校正 P 值 < 0.05 ,绘制火山图。

1.2.2 细胞转染 接种对数生长期的MDA-MB-231和MCF-7细胞于6孔板中,培养16~18 h待细胞贴壁,当细胞密度达70%左右时进行转染。首先配制转染体系,用125 μL DMEM高糖培养基稀释si-NC、si-circ_0007444#1、si-circ_0007444#2、miR-6838-5p mimic-NC、miR-6838-5p mimic、miR-6838-5p inhibitor-NC、miR-6838-5p inhibitor、si-CEP55和OE-CEP55各4 μL ,共转染体系包括si-circ_0007444+miR-6838-5p inhibitor-NC组, si-circ_0007444+miR-6838-5p inhibitor组, si-circ_0007444+OE-CEP55组,轻轻吹吸混匀3~5次,室温静置5 min。用125 μL DMEM高糖培养基稀释转染试剂4 μL ,轻轻吹吸混匀3~5次,室温静置5 min,加入上述转染体系或共转染体系,吹吸混匀3~5次,室温下孵育20 min。静置期间,将6孔板中各组别用

PBS清洗3次, 更换新的DMEM高糖培养基750 μ L。静置结束后, 将250 μ L配好的转染体系逐滴加入到对应孔中, 置于细胞培养箱中继续培养4~6 h。最后, 取出6孔板并用PBS清洗3次, 加入新鲜的完全培养液, 培养24 h收集细胞进行功能实验。

1.2.3 RT-qPCR 利用细胞RNA提取试剂盒提取总RNA, 用NanoDrop检测RNA浓度, 按照逆转录试剂盒说明书配制逆转录反应体系, 分别进行cDNA和miRNA逆转录。按照实时定量试剂盒说明书分别检测mRNA和miRNA表达量。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对定量PCR的检测结果进行统计学分析, 计算目的基因相对表达量。*GAPDH*为circRNA和mRNA表达的内参, *U6*为miRNA表达的内参。本研究中使用的引物如下:
*GAPDH*上游引物5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3', *GAPDH*下游引物5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'; *RHOBTB3*上游引物5'-ATA AGC CGA TGC TTG CCG AT-3', *RHOBTB3*下游引物5'-GCT GCC ATC ACT TCA CAA CG-3'; circ_0007444上游引物5'-TTC AGT GGG AAG AAT TGG AAG AA-3', circ_0007444下游引物5'-TGG CAG CAG AAC AGC AAG TTA-3'; *U6*上游引物5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', *U6*下游引物5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; miR-6838-5p逆转录引物5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GGA GT-3'; miR-6838-5p上游引物5'-GGT AAG CAG CAG TGG CAA G-3', miR-6838-5p下游引物5'-AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT-3'; *CEP55*上游引物5'-GGA GGG CAG ACC ATT TCA GAG-3', *CEP55*下游引物5'-AGG CTT CGA TCC CCA CTT AC-3'。

1.2.4 RNase R实验 细胞RNA提取试剂盒提取转染细胞的总RNA, 加入RNase R(3 U/ μ g), 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。通过逆转录和RT-qPCR评估环状circ_0007444和线性RHOBTB3的表达情况。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳 利用细胞RNA提取试剂盒提取MDA-MB-231的RNA, 通过逆转录得到cDNA, 同时按照DNA提取试剂盒说明书提取基因组DNA(genomic DNA, gDNA)。根据PCR试剂盒说明书对提取的cDNA和gDNA进行扩增。将DNA样品与上样缓冲液混合(4:1), 用移液枪缓慢加入配制好的琼脂糖凝胶点样孔。第一孔加入DNA Marker作为参照。观察染料迁移至胶长2/3时停止电泳。

将琼脂糖凝胶置于琼脂糖凝胶成像仪上观察条带并拍照记录。

1.2.6 平板克隆 将转染的细胞于37 $^{\circ}$ C胰酶消化5 min后计数, 并将其接种至6孔板(细胞密度调整为500/孔)。每3天更换1次新鲜的细胞完全培养基。培养两周后, 用PBS洗涤3遍, 加入4%多聚甲醛, 室温固定20 min。PBS洗涤3遍后, 加入结晶紫染料, 室温染色20 min。PBS洗去未结合的染料, 拍照观察细胞集落的数量, 并用ImageJ对细胞克隆数进行分析。

1.2.7 Transwell迁移实验 将转染的细胞胰酶消化计数后用200 μ L无血清培养基重悬 2×10^4 个细胞, 将细胞悬液加入Transwell迁移小室的上层, 加入600 μ L含10% FBS的完全培养基于Transwell迁移小室下层。在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C)中培养12~24 h。弃去上室培养基, PBS洗涤小室3遍, 用4%多聚甲醛室温固定30 min。PBS洗涤小室3遍, 结晶紫染料染色15 min。PBS洗涤小室3遍, 用棉签小心擦去迁移小室上层表面未穿过滤膜的细胞。室温晾干后通过显微镜拍照并用ImageJ计算细胞迁移数量。

1.2.8 蛋白质印迹法 在6孔板中按200:1的比例加入RIPA裂解液和PMSF, 冰上静置15 min后用细胞刮刮取细胞, 将细胞裂解液收集至1.5 mL的EP管中, 用涡旋振荡器充分裂解, 每5 min振荡1次, 振荡3次后4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心15 min, 小心吸取上清液至新的EP管中, 取3 μ L用NanoDrop检测样本蛋白浓度。于蛋白提取液中加入1/4体积的5 $\times$ 蛋白加样缓冲液, 混匀后沸水浴煮10 min, 冰上冷却后直接检测或者置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。电泳前, 根据所测目的蛋白分子量大小, 按照雅酶PAGE凝胶快速制备试剂盒说明书中的方法和比例配制分离胶及浓缩胶。拔出凝胶中的梳子, 在上样孔中按实验设计顺序加入蛋白样本。设置电泳程序, 先上层胶70 V电泳30 min, 随后下层胶120 V电泳60 min。电泳完成后, 将SDS-PAGE凝胶转移至用甲醇活化的PVDF膜上, 冰水浴恒流200 mA, 60 min进行转膜。转膜结束后将PVDF膜放于5%脱脂牛奶中, 在摇床上室温封闭2 h。根据实验需要裁膜后, 加入对应1 $\times$ TBST稀释的一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日, 用1 $\times$ TBST洗涤条带, 5 min/次, 洗3次。二抗(1:2 000)摇床上室温孵育1 h后, 用1 $\times$ TBST洗涤条带, 5 min/次, 洗3次。利用化学发光凝胶成像分析仪, 在条带上滴加曝光液进行显影。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 接种对数生长

期的293T细胞于24孔板中,当细胞密度达70%左右时进行转染。实验分为四组,分别为circ_0007444-WT+miR-6838-5p mimic、circ_0007444-WT+miR-6838-5p mimic-NC、circ_0007444-MUT+miR-6838-5p mimic、circ_0007444-MUT+miR-6838-5p mimic-NC,每组设置3个复孔,置于37 °C细胞培养箱中培养48 h后,吸去原有的培养基,并用预冷的PBS轻轻洗涤3次。根据荧光素酶检测试剂盒说明书,每孔加入100 μ L稀释好的细胞裂解液,摇床上充分裂解30 min。将裂解后的液体吸至1.5 mL的EP管中,4 °C、10 000 $\times$ g离心10 min后转移上清到新的EP管。取10 μ L裂解液与提前配制好的100 μ L萤火虫荧光素酶检测试剂快速混匀后置于生物化学发光检测仪测定萤火虫荧光酶荧光值。随后再加入100 μ L海肾荧光素酶检测试剂快速混匀测定海肾荧光酶荧光值。记录萤火虫荧光素酶反应强度与内参海肾荧光素酶反应强度比值。

1.3 统计学分析

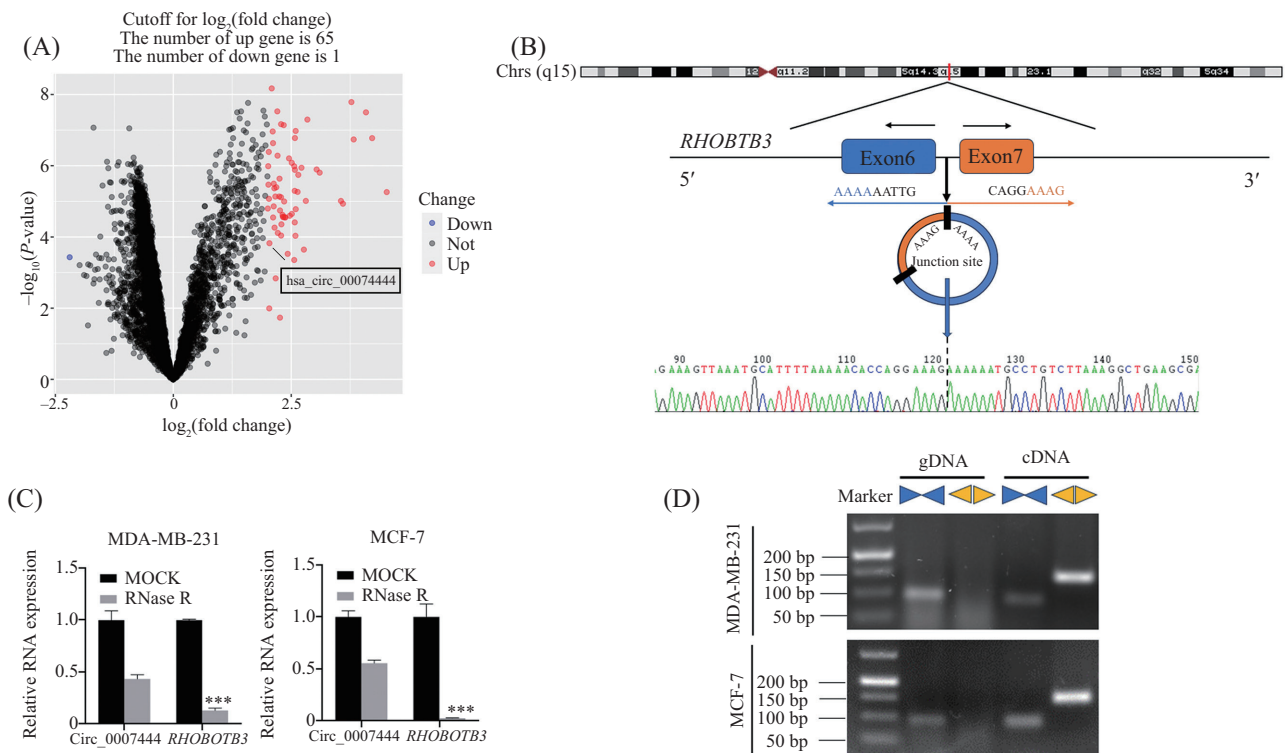
使用 Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析与

作图,所有结果均用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示。两组之间比较用独立样本 t 检验分析;两组以上均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 Circ_0007444的筛选及环形结构的验证

在数据集GSE182471中,通过RStudio对5对乳腺癌组织样本和邻近的非肿瘤组织样本的circRNAs微阵列原始数据进行差异分析,设置阈值 $|\log_2(\text{fold change, FC})|>2$ 、校正 P 值 <0.05 并绘制火山图,共发现差异表达的66个circRNAs,其中65个显示显著上调(图1A)。通过查阅相关文献以及预实验选定circ_0007444作为研究对象。CircBase数据库显示circ_0007444是由亲本基因RHOTB3的外显子6至外显子7环化形成的,Sanger测序进一步证实了circ_0007444的PCR产物的首尾剪接序列的



A: GSE182471差异circRNAs的火山图. B: circ_0007444基因组位置 and Sanger测序结果. C: RNase R(3 U/ μ g)处理RNA后, RT-qPCR检测circ_0007444和对应线性转录本RHOTB3的表达. $n=3$, *** $P<0.001$, 与MOCK组比较. D: 琼脂糖凝胶电泳验证circ_0007444的环形结构.

A: volcano plot illustrating differentially expressed circRNAs from GSE182471. B: genomic location of circ_0007444 and its Sanger sequencing results. C: following RNase R (3 U/ μ g) treatment, the expression levels of circ_0007444 and its corresponding linear transcript RHOTB3 were assessed using RT-qPCR. $n=3$, *** $P<0.001$ compared with MOCK group. D: the circular structure of circ_0007444 was confirmed via agarose gel electrophoresis.

图1 Circ_0007444的筛选及环形结构验证

Fig.1 Screening and of validation of the circular structure of circ_0007444

存在(图1B)。RNase R实验的结果表明,相比线性RHOBTB3, circ_0007444的表达在RNase R处理后没有显著变化(图1C)。琼脂糖凝胶电泳结果显示,使用收敛引物,可以对cDNA和gDNA进行扩增;相反,使用发散引物, cDNA可以进行扩增而gDNA无法进行扩增,以上结果表明 circ_0007444为环形结构(图1D)。

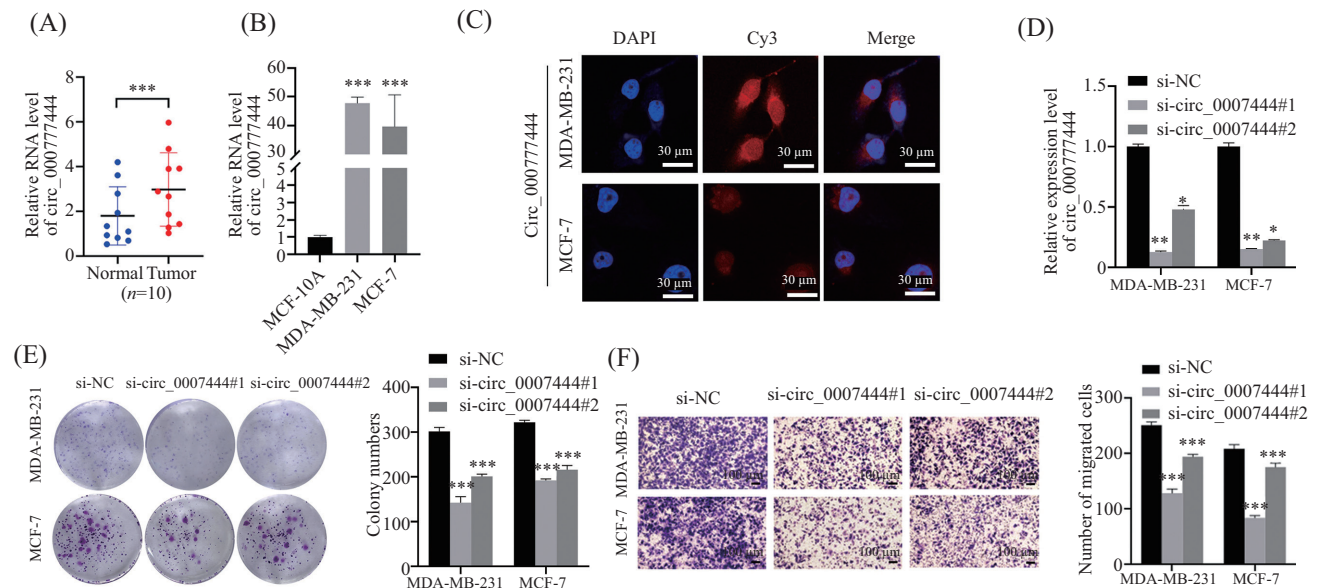
2.2 Circ_0007444调节MDA-MB-231和MCF-7细胞的生物学功能

通过RT-qPCR检测了10对BC组织及其匹配的邻近正常组织中 circ_0007444的表达情况,结果显示,与相邻正常组织相比, circ_0007444在BC组织中高表达(图2A)。Circ_0007444在BC细胞株MDA-MB-231和MCF-7中的表达水平也显著高于正常乳腺上皮细胞MCF-10A(图2B)。RNA FISH结果表明, circ_0007444主要定位于MDA-MB-231和MCF-7细胞胞质中,因此, circ_0007444可能作为ceRNA发挥作用(图2C)。RT-qPCR结果

显示,转染 si-circ_0007444质粒的MDA-MB-231和MCF-7细胞中 circ_0007444的表达受到显著抑制,且 si-circ_0007444#1的敲低效率高于 si-circ_0007444#2(图2D)。细胞集落形成实验检测结果显示, circ_0007444被敲低后,MDA-MB-231和MCF-7细胞集落形成数量显著下降(图2E)。细胞划痕和Transwell实验的检测结果显示,转染 si-circ_0007444后,MDA-MB-231和MCF-7细胞的迁移能力受到明显抑制(图2F)。这些结果表明, circ_0007444促进了MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和迁移。

2.3 Circ_0007444作为miR-6838-5p的分子海绵调节MDA-MB-231和MCF-7细胞的生物学功能

为了确定 circ_0007444所靶向的miRNAs,通过Starbase、CircBank和Circular RNA Interactome三个公共数据库进行预测,发现miR-6838-5p与 circ_0007444存在结合位点。根据两者结合位点构建 circ_0007444野生株和突变株质粒,通过双荧光素



A: RT-qPCR检测circ_0007444在10对BC组织和癌旁组织中的表达情况。n=10, ***P<0.001, 与Normal组相比。B: RT-qPCR检测circ_0007444在MDA-MB-231和MCF-7细胞中的表达。n=3, ***P<0.001, 与MCF-10A相比。C: RNA FISH实验检测circ_0007444在MDA-MB-231和MCF-7中的定位。D: RT-qPCR检测MDA-MB-231和MCF-7细胞中circ_0007444沉默效率。E: 平板克隆形成实验分析沉默circ_0007444对MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖能力的影响。F: Transwell细胞迁移实验分析沉默circ_0007444对MDA-MB-231和MCF-7细胞迁移能力的影响。n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与si-NC组比较。

A: RT-qPCR was used to detect the expression of circ_0007444 in 10 pairs of BC tissues and adjacent tissues. n=10, ***P<0.001 compared with Normal group. B: RT-qPCR was used to detect the expression of circ_0007444 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. n=3, ***P<0.001 compared with MCF-10A group. C: RT-qPCR was used to detect the localization of circ_0007444 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. D: RNA FISH was used to detect the silencing efficiency of circ_0007444 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. E: the plate clone formation assay was used to analyze the effect of silencing circ_0007444 on the proliferation ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells. F: the Transwell cell migration assay was used to analyze the effect of silencing circ_0007444 on the migration ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells. n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with si-NC group.

图2 Circ_0007444调节MDA-MB-231和MCF-7细胞的生物学功能

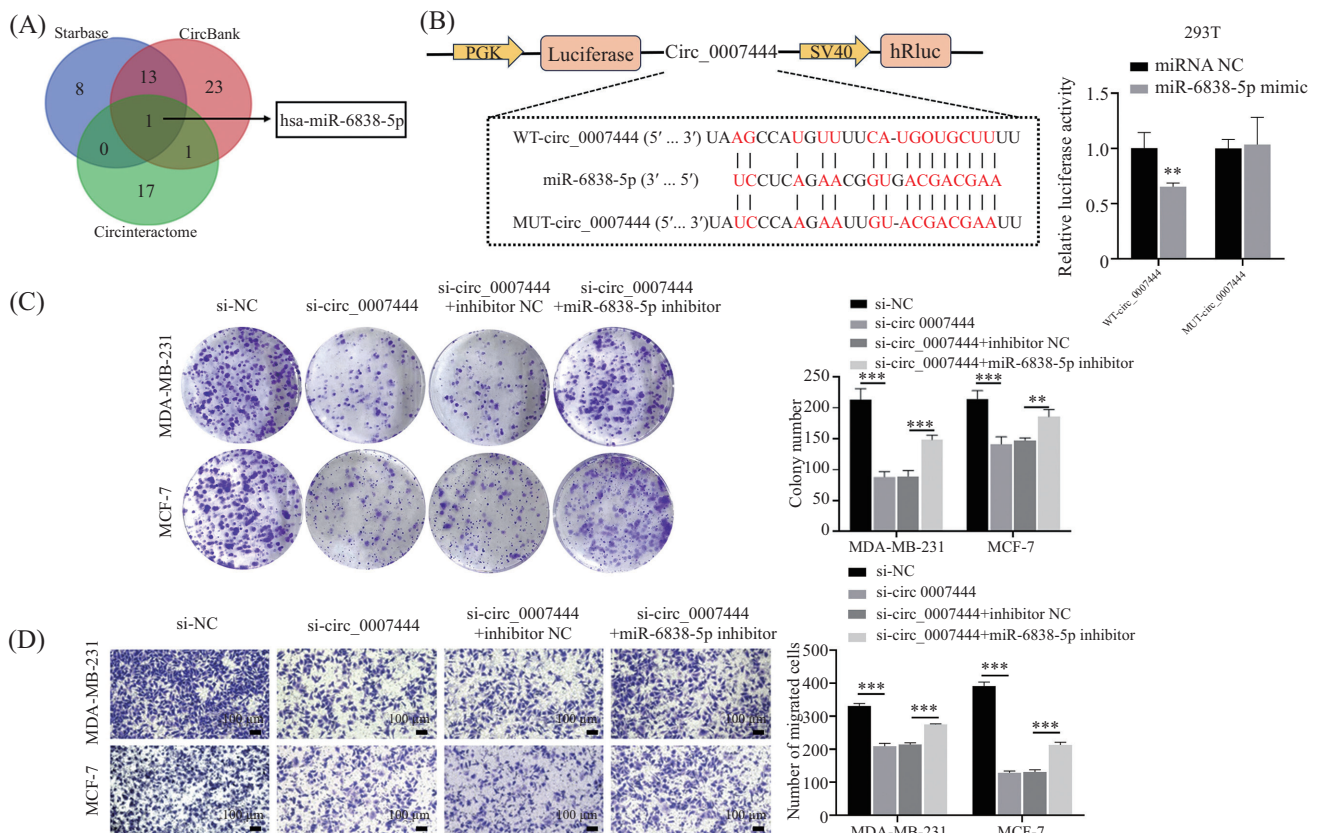
Fig.2 Circ_0007444 affects the biological function of MDA-MB-231 and MCF-7 cells

酶报告实验检测 circ_0007444 与 miR-6838-5p 之间是否直接相互作用。结果显示, 共转染 circ_0007444-WT 荧光素酶报告质粒和 miR-6838-5p mimic 后, HEK-293T 细胞中的荧光素酶活性减弱, 而共转染 circ_0007444-MUT 荧光素酶报告质粒和 miR-6838-5p mimic 后, HEK-293T 细胞中的荧光素酶活性无明显变化, 证实了 circ_0007444 和 miR-6838-5p 之间存在相互作用。由于 si-circ_0007444#1 的敲低效率高于 si-circ_0007444#2, 我们选择 si-circ_0007444#1 完成后续相关实验。同时, 经过 RT-qPCR 验证, 在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中敲低 circ_0007444 促进 miR-6838-5p 的表达。因此, 所有数据表明 circ_0007444 可以在 BC 中海绵化 miR-6838-5p。将

si-circ_0007444 和 miR-6838-5p inhibitor 共转染到 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中, 平板克隆形成实验、细胞划痕和 Transwell 实验结果表明 si-circ_0007444 和 miR-6838-5p inhibitor 共转染可以挽救单独敲低 circ_0007444 对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖、迁移的抑制(图3)。上述实验结果提示 circ_000744 通过靶向 miR-6838-5p 来调节 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的增殖、迁移过程。

2.4 Circ_0007444 通过 miR-6838-5p/CEP55 轴调节 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的生物学功能

通过数据库 Starbase、miRWalk、miRTarBase、GEPIA 预测 miR-6838-5p 调控的下游靶基因, 取交集后发现 CEP55 与 miR-6838-5p 具有互补结合位点(图

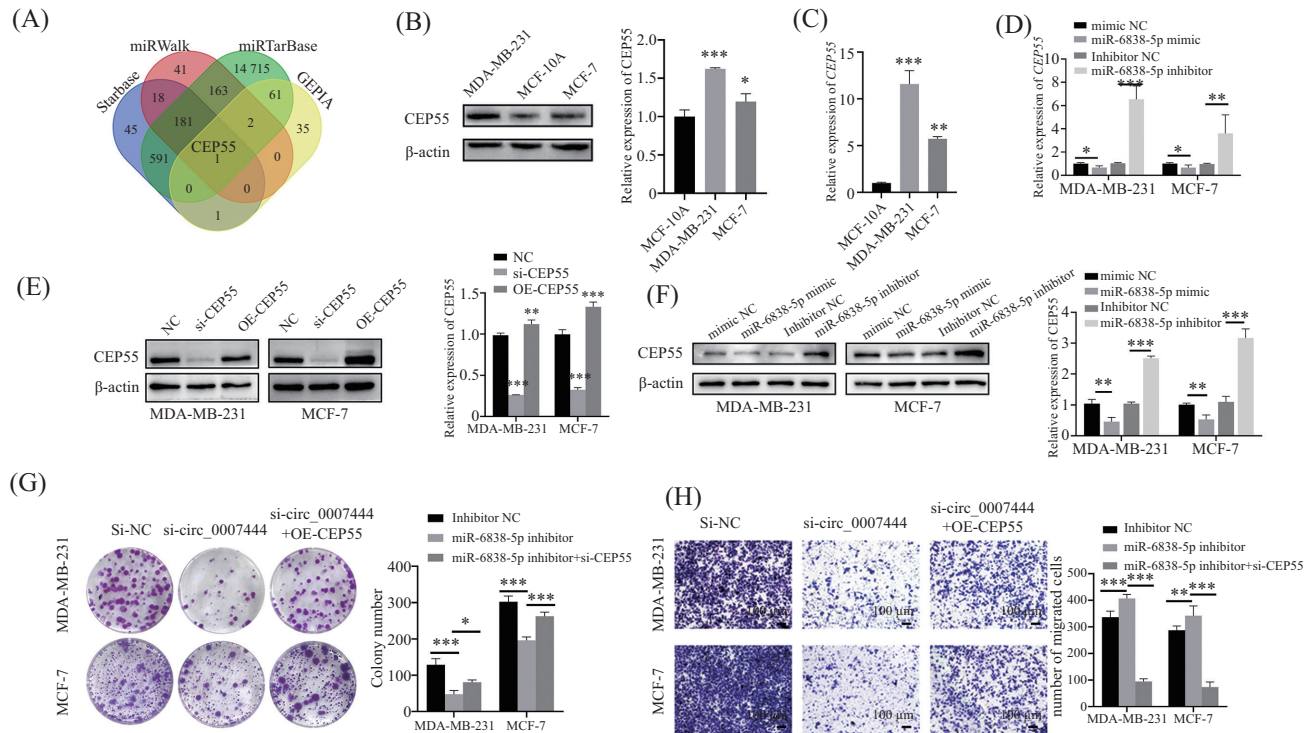


A: Starbase、CircBank 和 Circular RNA Interactome 预测与 circ_0007444 结合的 miRNA 并取交集。B: 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-6838-5p 对 circ_0007444 的相对荧光素酶活性的影响。n=3, **P<0.01, 与 miRNA NC 组相比。C: 平板克隆形成实验分析 miR-6838-5p inhibitor 与 si-circ_0007444 共转染对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖能力的影响。D: Transwell 细胞迁移实验分析 miR-6838-5p inhibitor 与 si-circ_0007444 共转染对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞迁移能力的影响。n=3, **P<0.01, ***P<0.001。

A: Starbase, CircBank and Circular RNA Interactome were used to predict miRNAs that bind to circ_0007444 and the intersection was taken. B: the effect of miR-6838-5p on the relative luciferase activity of circ_0007444 was detected by dual-luciferase reporter gene assay. n=3, **P<0.01 compared with miRNA NC group. C: the effect of co-transfection of miR-6838-5p inhibitor and si-circ_0007444 on the proliferation ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells was analyzed by plate clone formation assay. D: the effect of co-transfection of miR-6838-5p inhibitor and si-circ_0007444 on the migration ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells was analyzed by Transwell cell migration assay. n=3, **P<0.01, ***P<0.001.

图3 Circ_0007444 作为 miR-6838-5p 的分子海绵调节 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的生物学功能

Fig.3 Circ_0007444 modulates the biological functions of MDA-MB-231 and MCF-7 cells by acting as a molecular sponge for miR-6838-5p



A: 数据库Starbase、miRWalk、miRTarBase、GEPIA预测miR-6838-5p调控的靶基因并通过韦恩图取交集。B: 蛋白质印迹法检测CEP55在MDA-MB-231和MCF-7细胞中的表达情况。 $*P<0.05$, $***P<0.001$, 与MCF-10组相比。C: RT-qPCR检测CEP55在MDA-MB-231和MCF-7细胞中的表达情况。 $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与MCF-10组相比。D: RT-qPCR检测敲低和过表达miR-6838-5p后MDA-MB-231和MCF-7细胞中CEP55的mRNA表达情况。E: 蛋白质印迹法检测敲低和过表达CEP55的转染效率。 $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与NC组相比。F: 蛋白质印迹法检测敲低和过表达miR-6838-5p后MDA-MB-231和MCF-7细胞中CEP55蛋白质表达情况。G: 平板克隆形成实验分析OE-CEP55与si-circ_0007444共转染对MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖能力的影响。H: Transwell细胞迁移实验分析OE-CEP55与si-circ_0007444共转染对MDA-MB-231和MCF-7细胞迁移能力的影响。 $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: Starbase, miRWalk, miRTarBase and GEPIA predicted the target genes regulated by miR-6838-5p and took the intersection through Venn diagram. B: the expression of CEP55 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells was detected by Western blot. $*P<0.05$, $***P<0.001$ compared with MCF-10 group. C: the expression of CEP55 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells was detected by RT-qPCR. $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with MCF-10 group. D: the mRNA expression of CEP55 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells after knockdown and overexpression of miR-6838-5p was detected by RT-qPCR. E: the transfection efficiency of knockdown and overexpression CEP55 was detected by Western blot. $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with NC group. F: Western blot was used to detect CEP55 protein expression in MDA-MB-231 and MCF-7 cells after knockdown and overexpression of miR-6838-5p. G: the effect of co-transfection of OE-CEP55 and si-circ_0007444 on proliferation of MDA-MB-231 and MCF-7 cells was analyzed by plate cloning assay. H: transwell cell migration assay was used to analyze the effect of co-transfection of OE-CEP55 and si-circ_0007444 on the migration ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 Circ_0007444通过miR-6838-5p/CEP55轴调节MDA-MB-231和MCF-7细胞的生物学功能

Fig.4 Circ_0007444 regulates the biological functions of MDA-MB-231 and MCF-7 cells through the miR-6838-5p/CEP55 axis

4A)。蛋白质印迹法和RT-qPCR结果显示相比正常乳腺上皮MCF-10A细胞, CEP55在BC细胞MDA-MB-231和MCF-7中高表达(图4B和图4C)。Western blot实验证实了敲低和过表达CEP55分别可以抑制和促进MDA-MB-231和MCF-7细胞中CEP55的表达(图4E)。RT-qPCR和Western blot结果显示过表达miR-6838-5p抑制了MDA-MB-231和MCF-7细胞中CEP55的mRNA和蛋白质表达, 敲低miR-6838-5p可以促进CEP55的mRNA和蛋白质表达(图4D和图4F)。以上结果表明CEP55在BC中可以作为miR-

6838-5p的靶标。将OE-CEP55和si-circ_0007444共转染到MDA-MB-231和MCF-7细胞中, 从细胞功能学层面研究circ_0007444是否通过miR-6838-5p/CEP55轴调控BC的进展。平板克隆形成实验结果表明OE-CEP55和si-circ_0007444共转染会逆转单独敲低si-circ_0007444对MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖、迁移造成的抑制作用(图4G和图4H)。上述实验结果提示circ_0007444可以通过miR-6838-5p/CEP55轴促进MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和迁移。

3 讨论

CircRNAs在肿瘤发生发展中的功能研究已成为ncRNA领域的热点。越来越多的证据表明, circRNAs通过调控肿瘤细胞多个关键生物学过程参与肿瘤进展。Circ_000744被发现在多种癌症中发挥重要调控作用, 包括宫颈癌、上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)、结直肠癌、肝癌、胃癌等^[13-17]。例如, circRHOBTB3(即 circ_000744)在EOC细胞中显著下调, 可以作为miR-23a-3p的ceRNA来抑制EOC细胞的增殖和侵袭, 同时促进细胞凋亡并激活PTEN/AKT信号通路^[14]; 体内过表达的circRHOBTB3可以通过与RNA结合蛋白HuR相互作用降低下游PTBP1的表达水平, 从而抑制体内结直肠癌肺转移^[18]。然而, circ_000744在BC中作用从未被探索过。我们通过生物信息学分析发现circ_000744在BC中高表达, 并且敲低circ_000744可以抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和迁移。所以, circ_000744在BC进展过程中发挥重要的致癌作用。

CircRNAs作为ceRNA的核心功能在于通过吸附miRNAs调控下游靶基因的表达, 进而形成多层次分子调控网络。我们在这项研究中发现si-circ_0007444和miR-6838-5p inhibitor共转染会逆转单独敲低circ_0007444所对MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖和迁移造成的抑制作用。因此, circ_000744可以作为miR-6838-5p的ceRNA来调节MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖、迁移过程。已有文献报道miR-6838-5p可以靶向WNT3A抑制Wnt通路来抑制三阴性乳腺癌中的细胞增殖、转移和EMT过程^[19]。过表达miR-6838-5p也可以调节盘基蛋白结构域受体酪氨酸激酶1(discoidin domain receptor 1, DDR1)的表达抑制MCF-7细胞增殖^[20]。这表明miR-6838-5p在BC中主要作为肿瘤抑制因子发挥作用。

CEP55是一种癌症睾丸抗原, 被报道在22种癌症中显著高表达, 并且与免疫细胞浸润密切相关, 进而影响机体对免疫治疗和小分子药物的抗肿瘤反应^[21], 因此, CEP55可以作为一种有前途的免疫干预标志物来调节肿瘤进展。此外, CEP55已被证明在BC中上调, 并与不良预后密切相关^[22]。我们的数据证实了这些发现, miR-6838-5p直接靶向调节CEP55的表达, circ_0007444可以通过miR-6838-5p/CEP55轴促进MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖和迁移,

揭示了BC中新的ceRNA调控轴。未来将增加乳腺癌临床组织样本数量, 并且将组织中circ_0007444的表达情况与患者性别、患者年龄、肿瘤大小、TNM分期、有无淋巴结转移和远处转移、脉管侵犯深度等临床病例特征进行相关性分析, 进一步探究circ_0007444与乳腺癌临床预后的关系。此外, 未来裸鼠皮下瘤模型的构建也将进一步验证敲低circ_0007444对乳腺癌细胞在体内生长的影响。

随着基因组测序技术与无创诊断技术的突破, circRNAs基于共价闭合环状结构, 在血液、外泌体及多种体液中具有显著高于线性RNA的稳定性, 为疾病的无创诊断提供了分子基础。CircRNAs还表现出高度组织和细胞特异性, 该特性使其成为液体活检的理想靶标。因此, 未来可通过检测患者组织或外周血中circ_0007444的表达水平, 开发基于circ_0007444的液体活检标志物, 以用于BC早期诊断或治疗反应监测。

目前, circRNAs的体内递送仍面临挑战, 如核酸酶降解、脱靶效应及免疫原性。未来研究可以结合新型递送载体来提高靶向性, 并且设计circ_0007444特异性siRNA或shRNA, 联合CEP55抑制剂探索协同抗肿瘤效应。研究人员还通过单细胞测序技术解析circ_0007444/miR-6838-5p/CEP55轴在肿瘤异质性及微环境重塑中的作用。相较于传统化疗药物, 此类靶向干预策略具有高特异性与低毒副作用优势, 为克服BC耐药性提供了新思路, 推动了circRNAs从基础研究向临床应用的跨越。

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, LAVERANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63.
- [2] XU H, XU B. Breast cancer: epidemiology, risk factors and screening [J]. Chin J Cancer Res, 2023, 35(6): 565-83.
- [3] ARNOLD M, MORGAN E, RUMGAY H, et al. Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040 [J]. Breast, 2022, 66: 15-23.
- [4] ŁUKASIEWICZ S, CZECZELEWSKI M, FORMA A, et al. Breast cancer: epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies: an updated review [J]. Cancers, 2021, 13(17): 4287.
- [5] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 675-91.
- [6] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020,

- 21(8): 475-90.
- [7] JIN Z, XU W, YU K, et al. The novel circFKBP8/miR-432-5p/E2F7 cascade functions as a regulatory network in breast cancer [J]. *Hereditas*, 2024, 161(1): 27.
- [8] LIU H, WANG H, GAO W, et al. CircATP5C1 promotes triple-negative breast cancer progression by binding IGF2BP2 to modulate CSF-1 secretion [J]. *Cancer Biol Ther*, 2025, 26(1): 2479926.
- [9] WANG X, JIAN W, LUO Q, et al. CircSEMA4B inhibits the progression of breast cancer by encoding a novel protein SEMA4B-211aa and regulating AKT phosphorylation [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 794.
- [10] 刘伟, 张俊, 张佳雯, 等. Circ_0022382/let-7a-5p/PI3K/AKT/mTOR轴促进乳腺癌细胞增殖和迁移[J]. *江苏大学学报(医学版)*(LIU W, ZHANG J, ZHANG J W, et al. Circ_0022382/let-7a-5p/PI3K/AKT/mTOR axis promotes the proliferation and migration of breast cancer cells [J]. *Journal of Jiangsu University, Medicine Edition*), 2025, 35(2): 145-53.
- [11] SANG Y, CHEN B, SONG X, et al. circRNA_0025202 regulates Tamoxifen sensitivity and tumor progression via regulating the miR-182-5p/FOXO3a axis in breast cancer [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(9): 1638-52.
- [12] LI W, JIN G, ZHOU H, et al. Exosome-transported circ_0001955 as a potent driver of breast cancer by regulating the miR-708-5p/PGK1 axis [J]. *Thorac Cancer*, 2024, 15(35): 2486-99.
- [13] REN A, GONG F, LIU G, et al. NR1H4-mediated circRHOBTB3 modulates the proliferation, metastasis, and Warburg effects of cervical cancer through interacting with IGF2BP3 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(12): 2671-81.
- [14] FU Y, SUN H. The molecular mechanism of circRHOBTB3 inhibits the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer by serving as the ceRNA of miR-23a-3p [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 66.
- [15] CHEN C, YU H, HAN F, et al. Tumor-suppressive circRHOBTB3 is excreted out of cells via exosome to sustain colorectal cancer cell fitness [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 46.
- [16] DENG G, MOU T, HE J, et al. Circular RNA circRHOBTB3 acts as a sponge for miR-654-3p inhibiting gastric cancer growth [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 1.
- [17] HU G, ZHAI S, YU S, et al. Circular RNA circRHOBTB3 is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses cell proliferation by inhibiting miR-18a maturation [J]. *Infect Agent Cancer*, 2021, 16(1): 48.
- [18] CHEN J, WU Y, LUO X, et al. Circular RNA circRHOBTB3 represses metastasis by regulating the HuR-mediated mRNA stability of PTBP1 in colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11(15): 7507-26.
- [19] LIU G, WANG P, ZHANG H. MiR-6838-5p suppresses cell metastasis and the EMT process in triple-negative breast cancer by targeting WNT3A to inhibit the Wnt pathway [J]. *J Gene Med*, 2019, 21(12): e3129.
- [20] 薛良军, 谈秋瑜, 许静文, 等. MiR-6838-5p过表达下调DDR1基因表达抑制乳腺癌MCF-7细胞的增殖[J]. *南方医科大学学报(XUE L J, TAN Q Y, XU J W, et al. MiR-6838-5p overexpression inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells by down-regulating DDR1 expression [J]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao*), 2024, 44(9): 1677-84.*
- [21] ZHOU L, ZHU Y, GUO F, et al. Pan-cancer analysis of oncogenic role of CEP55 and experiment validation in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 28279.
- [22] CHEN S, LUO Y, RUAN S, et al. RNA binding protein ILF3 increases CEP55 mRNA stability to enhance malignant potential of breast cancer cells and suppress ferroptosis [J]. *Hereditas*, 2025, 162(1): 10.