DOI:10.16016/j.2097-0927.202109206

环状 RNA circACTN4 促进乳腺癌细胞增殖、侵袭和转移的研究

欧小强,陈俊霞 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室

[摘要] **目的** 探讨环状 RNA circACTN4(hsa_circ_0050900)在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌细胞增殖、侵袭和转移的影响。**方法** 利用环状 RNA 芯片分析 4 对乳腺癌组织和癌旁组织的 circRNA 表达谱,并用实时荧光定量 PCR 验证 circACTN4 的相对表达水平;用 circACTN4 过表达质粒及对照质粒分别转染乳腺癌细胞 MCF-7/MDA-MB-231,采用 CCK-8 实验、EdU 实验、平板克隆实验、细胞划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验研究 circACTN4 在乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用;Western blot 检测 circACTN4 对 CCND1、CCND2 和 CDK4 蛋白表达的影响;在裸鼠体内探讨 circACTN4 对移植瘤生长转移的影响。**结果** CircACTN4 在乳腺癌组织中的表达高于癌旁组织($P<0.01$),在乳腺癌细胞中的表达高于正常乳腺上皮细胞($P<0.01$)。上调 circACTN4 可增强乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭($P<0.05$),提高 CCND1、CCND2 和 CDK4 蛋白的表达($P<0.01$)。体内实验结果表明:上调 circACTN4 可促进移植瘤生长与转移,与对照组相比,circACTN4 组肿瘤微血管密度显著增加($P<0.05$),肺转移结节数量明显增多($P<0.05$)。**结论** circACTN4 在乳腺癌组织和细胞显著高表达,可增强乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并在体内促进移植瘤的生长与转移。

[关键词] circRNA;circACTN4;乳腺癌;移植瘤

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

Circular RNA circACTN4 promotes proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells

OU Xiaoqiang, CHEN Junxia Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of circular RNA circACTN4 (also called hsa_circ_0050900) in breast cancer (BC) and its effect on the proliferation, invasion and metastasis of BC cells. **Methods** The circRNA expression profiles of 4 pairs of BC tissues and adjacent tissues were analyzed by circRNA chip analysis, and the relative expression level of circACTN4 was detected by qRT-PCR. After BC cell lines MCF-7/MDA-MB-231 were transfected with circACTN4 overexpression plasmid and control plasmid, respectively, the effects of circACTN4 on cell proliferation, migration and invasion were tested by Cell Counting Kit-8 (CCK-8), EdU assay, colony formation, scratching assay, and Transwell migration and invasion assay. Western blotting was executed to determine the protein expression of CCND1, CCND2 and CDK4. The effects of circACTN4 on the growth and metastasis of transplanted tumors were also observed in nude mice. **Results** The expression of circACTN4 was significantly higher in BC tissues and cells than in the paired adjacent tissues and normal breast epithelial cells ($P<0.01$). Up-regulation of circACTN4 enhanced the proliferation, migration and invasion of BC cells ($P<0.05$), and facilitated the expression of CCND1, CCND2 and CDK4 ($P<0.01$). The results of *in vivo* experiments also showed that up-regulation of circACTN4 promoted the growth and metastasis of transplanted tumors, with the tumor microvascular density and the number of lung metastatic nodules significantly increased in the circACTN4 group, as compared with the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82173170,82103089)

[通信作者] 陈俊霞,E-mail:chjunxia@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

control group ($P<0.05$). **Conclusion** circACTN4 is highly expressed in BC tissues and cells. It can promote the proliferation, migration and invasion of BC cells, and facilitate the growth and metastasis of transplanted tumors *in vivo*.

[**Key words**] circular RNA; circACTN4; breast cancer; transplanted tumor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173170, 82103089). Corresponding author: CHEN Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

乳腺癌是全球女性死亡的主要病因之一,尽管随着现代医学的发展,其早期诊断和联合治疗已显著提高了患者的生存率,但在我国乳腺癌的发病率仍高居女性恶性肿瘤的首位,严重威胁女性的生命健康[1]。因此,探索乳腺癌早期诊断和药物治疗的新靶点已成为乳腺癌早期筛查与精准诊疗的迫切需求。CircRNA是一种呈闭合环状结构的RNA,主要由前体mRNA(pre-mRNA)通过"反向剪接"(一种可变RNA剪接)产生,且其大部分位于细胞质中,仅有少部分位于细胞核中[2]。与线性RNA相比,circRNA的共价环状结构不易被核酸外切酶降解,结构稳定性更高[3]。近年来,随着新一代测序技术和生物信息学的快速发展,发现circRNA不仅具有多种生物学功能,还可以在多个水平上调控基因表达[4]。尤其是circRNA能够在多种恶性肿瘤和正常组织中呈现差异化表达,参与包括乳腺癌在内的一系列肿瘤的发生、发展过程[5-8]。例如,近来研究发现,circANKS1B可以通过诱导上皮间质转化(EMT)在体内、体外促进乳腺癌的侵袭和转移[9];circRNF20能够通过circRNF20/miR-487a/HIF-1α/HK2轴在乳腺癌的进展和Warburg效应中发挥重要的促进作用[10]。因此,由于circRNA与乳腺癌的发生和发展具有密切的关系,以及其独特的分子结构,使其有望成为乳腺癌早期诊断以及药物治疗的新靶点[11-13]。本研究前期通过高通量筛选发现:与癌旁组织相比,circACTN4是乳腺癌组织最异常高表达的circRNA。然而,目前circACTN4在乳腺癌,特别是在三阴乳腺癌中的具体作用和生物学功能还未完全阐明,其是否能成为乳腺癌早期筛查与精准诊疗的新靶点还有待进一步研究。本研究旨在探讨circACTN4在乳腺癌中的表达水平及其对乳腺癌增殖、侵袭和转移等生物学过程的影响,以期为乳腺癌早期诊断和靶向治疗提供依据和线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本及细胞株 在重庆医科大学附属第一医院获取乳腺癌手术切除后的乳腺癌组织与癌旁组织标本。40例患者均为女性,年龄36~72(53.25±9.03)岁,所获得的乳腺癌标本组织学类型均为浸润性导管癌。获得组织标本后立即用RNA保存液保存,并存放于液氮中。患者术前均签署书面知情同意书。本研究获得重庆医科大学伦理委员会的批准(CQMU 2010-26)。人正常乳腺上皮细胞MCF-10A、乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231均保存在本实验室液氮中。

1.1.2 实验动物及主要试剂 4周龄BALB/c雌性裸鼠购自重庆腾鑫生物科技有限公司。circACTN4过表达和对照质粒由广州吉塞生物科技有限公司构建并测序鉴定,将人全长circACTN4插入载体pLC5 ciR中得到过表达质粒,对照质粒是未装载circACTN4的空质粒载体。细胞培养所用的DMEM、MEBM培养基以及胎牛血清购自Saimike公司,胰蛋白酶购自北京鼎国生物科技有限公司,逆转录试剂盒以及qRT-PCR所用试剂购自日本TaKaRa公司,EdU和CCK8所用试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Transwell所用小室购自美国Millipore公司,CCND1(cyclin D1)、CCND2(cyclin D2)以及CDK4(cyclin-dependent kinase 4)抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 circRNA芯片分析 用TRIzol法提取4对乳腺癌组织和癌旁组织的总RNA,检测所得RNA的完整度、浓度以及纯度。RNA经质检合格后,在上海康成生物技术有限公司进行circRNA芯片分析,选取出差异倍数>2、$P<0.05$差异表达的circRNA,得到circRNA的差异表达谱,筛选出其中差异最明显的circRNA circACTN4。

1.2.2 细胞培养与转染 乳腺癌细胞MCF-7(非三阴乳腺癌细胞)以及MDA-MB-231(三阴乳腺癌细胞)使用含有10% FBS(胎牛血清)的DMEM培养基,正常乳腺上皮细胞MCF-10A使用MEBM培养基,在温度为37 ℃、CO_2体积分数为5%的细胞培养箱中培养。待细胞长到汇合度为60%~70%时进行转染,转染所用试剂为Lipofectamine™2000,加入转染试剂后用无血清培养基进行培养,5 h后换液成完全培养基。

1.2.3 qRT-PCR检测 用TRIzol法提取转染24 h后的细胞和组织中的总RNA,对其浓度和纯度进行检测,并用琼脂糖凝胶电泳判断总RNA完整性,将提取的总RNA按照20 μL反应体系逆转录成cDNA,反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 15 s。使用Bio-Rad公司

的 qRT-PCR 反应仪检测 circACTN4 的表达水平。circACTN4 的上游引物序列:5′-GGATGGTCTTGCCTTCAATGC-3′,下游引物序列:5′-CATGCCGTGAAGGTCCTCTG-3′,571 bp;GAPDH 上游序列:5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,下游引物序列:5′-GCAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′,140 bp。以 GAPDH 为内参,cDNA 为模板,进行 40 个循环反应,反应程序为:95 ℃/3 min 预变性,95 ℃/5 s 变性,60 ℃/30 s 退火,72 ℃/30 s 延伸。每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次,circACTN4 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.2.4 划痕实验检测细胞迁移 细胞转染后,待细胞培养 6 孔板中的细胞密度达到约 90%时,用 200 μL 枪头进行划痕,PBS 冲洗 3 次后于显微镜下观察拍照,加入无血清培养基继续培养 24 h 后再置于显微镜下观察拍照,依据 0 h 与 24 h 划痕距离的差值,计算细胞的相对迁移率。

1.2.5 Transwell 迁移与侵袭实验 Transwell 迁移实验:在 Transwell 小室上室中加入 100 μL 细胞悬液,小室下室中加入 500 μL 完全培养基。培养 24 h 后,用棉签轻轻拭去小室上表面的细胞,用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,0.1%的结晶紫染色 20 min,晾干后置于显微镜下观察并拍照。Transwell 侵袭实验:取 50 μL 基质胶稀释液(基质胶:无血清培养基=1:8)混匀后铺于 Transwell 小室上室面,于 4 ℃风干过夜。其余的操作与 Transwell 小室迁移实验相同。

1.2.6 CCK-8 实验检测细胞增殖 用 Bio-Rad 公司的细胞计数板对转染后的各组细胞进行计数,并制成细胞悬液(密度约为 2×10^4/mL),按 100 μL 每孔接种至 96 孔板中,设置 3 个复孔/组,待细胞贴壁后加入 CCK-8 溶液(10 μL/孔),在 37 ℃细胞培养箱中孵育 50 min,随后用酶标仪测量光密度值 D(450),之后分别将培养 24、48、72、96 h 后的各组细胞用同样的方法进行光密度测量,记录数值并绘制生长曲线。

1.2.7 EdU 实验检测细胞增殖 根据 Cell-Light™ EdU Apollo567 *In Vitro* Kit 试剂盒说明书对转染后的细胞进行 EdU 标记,4%多聚甲醛固定 30 min,用现配的 Apollo 染色液在避光条件下对细胞进行 Apollo 染色,用 Hoechst33343 在避光条件下对细胞进行 DNA 染色,最后经抗荧光淬灭剂封片后置于荧光显微镜下拍照。

1.2.8 克隆形成实验 将转染后细胞制成细胞悬液(密度约为 1×10^4/mL),按 100 μL/孔接种于 6 孔板中,于 37 ℃、CO_2 体积分数为 5%的细胞培养箱中培养。至第 5 天时进行半定量换液,第 10 天时弃去培养基,用 PBS 清洗 3 min,经多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 10 min,PBS 清洗 5 min,晾干后观察拍照并进行克隆计数。

1.2.9 Western blot 检测 用 RIPA 裂解液对转染 48 h 后的细胞进行总蛋白提取,用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液充分混合,100 ℃ 10 min 使蛋白质变性后冷却备用。将蛋白用 10% SDS-PAGE 恒压 80 V 电泳分离,然后将分离后的蛋白转到 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,在 4 ℃条件下孵育一抗(兔抗稀释比例如下:GAPDH 1∶5 000,CCND1 1∶1 000,CCND2 1∶1 000,CDK4 1∶1 000)过夜,TBST 缓冲液洗膜(10 min/3 次),37 ℃孵育二抗(稀释比例 1∶1 000)2 h,TBST 缓冲液洗膜(10 min/3 次),滴加 ELC 化学发光液在 Bio-Rad 成像仪中显色成像,用 Image J 进行数据处理与分析。

1.2.10 免疫组化实验 将石蜡切片进行脱蜡和水化,用枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol/L,pH=6.0)进行抗原修复,加入内源性过氧化物酶阻断剂在室温避光条件下孵育 10 min,加入封闭用血清,4 ℃孵育一抗(CCND1 1∶100,CCND2 1∶100,CDK4 1∶100)过夜,滴加生物素标记的二抗,37 ℃孵育 20 min,滴加链霉卵白素工作液,37 ℃孵育 20 min,用现配的 DAB 显色液室温孵育 5 min 显色,苏木精染色液进行复染,乙醇和二甲苯进行脱水,中性树脂封片,最后在显微镜下进行观察拍照。

1.2.11 裸鼠移植瘤实验 将 circACTN4 过表达质粒及对照质粒通过 Lipofectamine™ 2000 转染三阴乳腺癌细胞 MDA-MB-231,24 h 后更换新鲜培养基,并加入嘌呤霉素(浓度:600 ng/mL),每 3 天更换 1 次培养基。2 周后更换为维持培养基(嘌呤霉素浓度:300 ng/mL)并继续培养,2 周后获得 circACTN 过表达稳转细胞株。将 circACTN4 稳定过表达的 MDA-MB-231 细胞株及对照组细胞株分别注射到 BALB/c 雌性裸鼠皮下,circACTN4 过表达组和对应的对照组雌性裸鼠数量都为 5 只。每周观察移植瘤生长情况,并测量其体积(0.5×长×宽^2)。4 周后将裸鼠处死,取出移植瘤和肺,对移植瘤进行拍照和称量,然后用 4%多聚甲醛固定,后续进行石蜡切片的制作以及免疫组化和 HE 染色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析,用独立样本 t 检验进行两组均数比较,用单因素方差分析进行多组均数比较,定性变量相关性分析采用卡方检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circACTN4 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中高表达

采用 circRNA 芯片技术对 4 对乳腺癌组织和癌旁

组织进行差异 circRNA 表达分析,其中 circACTN4(hsa_circ_0050900)是上调倍数最高的 circRNA(图 1)。运用 qRT-PCR 检测 40 对乳腺癌组织和癌旁组织以及乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞中 circACTN4 的相对表达量。结果显示:circACTN4 在乳腺癌组织以及乳腺癌细胞中的相对表达量比癌旁组织和正常乳腺上皮细胞中的更高($P<0.01$,图 2)。在 40 例乳腺癌患者组织中,circACTN4 的表达与乳腺癌的 T($P=0.047$)、N($P=0.001$)与 TNM 分期($P=0.013$)存在正相关,同年龄、分级等临床病理参数无关(表 1)。

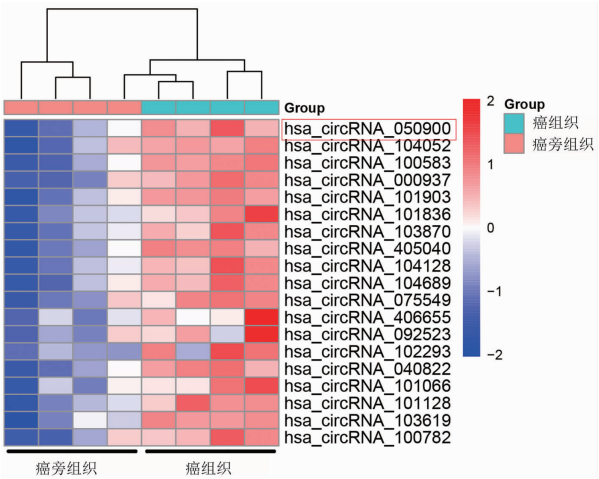
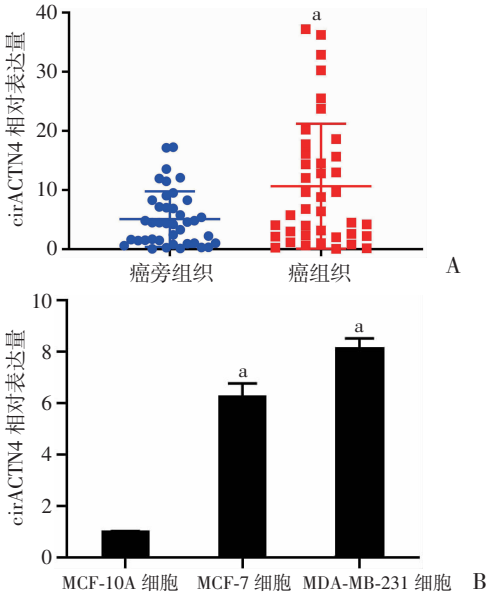


图 1 乳腺癌组织和癌旁组织中部分差异表达的 circRNA 热图



A:qRT-PCR 检测 40 例乳腺癌患者癌组织和癌旁组织中 cirACTN4 的表达 a:$P<0.01$,与癌旁组织比较;B:qRT-PCR 检测 circACTN4 在乳腺癌细胞系中的表达 a:$P<0.01$,与正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 比较

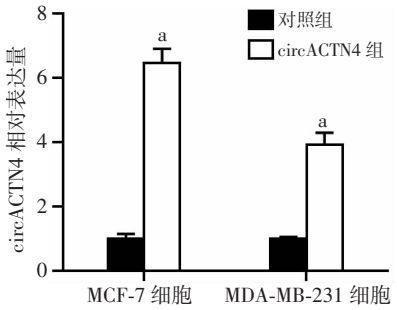
图 2 qRT-PCR 检测 circACTN4 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中的表达

表 1 circACTN4 的表达与乳腺癌患者临床病理特征之间的关系

临床病理特征	例数	CircACTN4 相对表达量		χ^2	P 值
		低	高		
总例数	40	20	20		
年龄/岁					
<54	23	11	12	0.102	0.749
≥54	17	9	8		
病理分级					
Ⅱ	23	14	9	2.558	0.110
Ⅲ	17	6	11		
T 期					
T1	14	10	4	3.956	0.047
T2~T4	26	10	16		
N 期					
N0	18	14	4	10.101	0.001
N1~N3	22	6	16		
TNM 分期					
Ⅰ	11	9	2	6.144	0.013
Ⅱ/Ⅲ	29	11	18		

2.2 circACTN4 过表达质粒的效率验证

用空载质粒和 circACTN4 过表达质粒转染 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞,circACTN4 的相对表达水平用 qRT-PCR 检测。结果显示:MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞转染过表达质粒后,与对照组相比,circACTN4 过表达组细胞的 circACTN4 相对表达水平显著提高($P<0.01$,图 3)。



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 3 circACTN4 过表达质粒效率验证

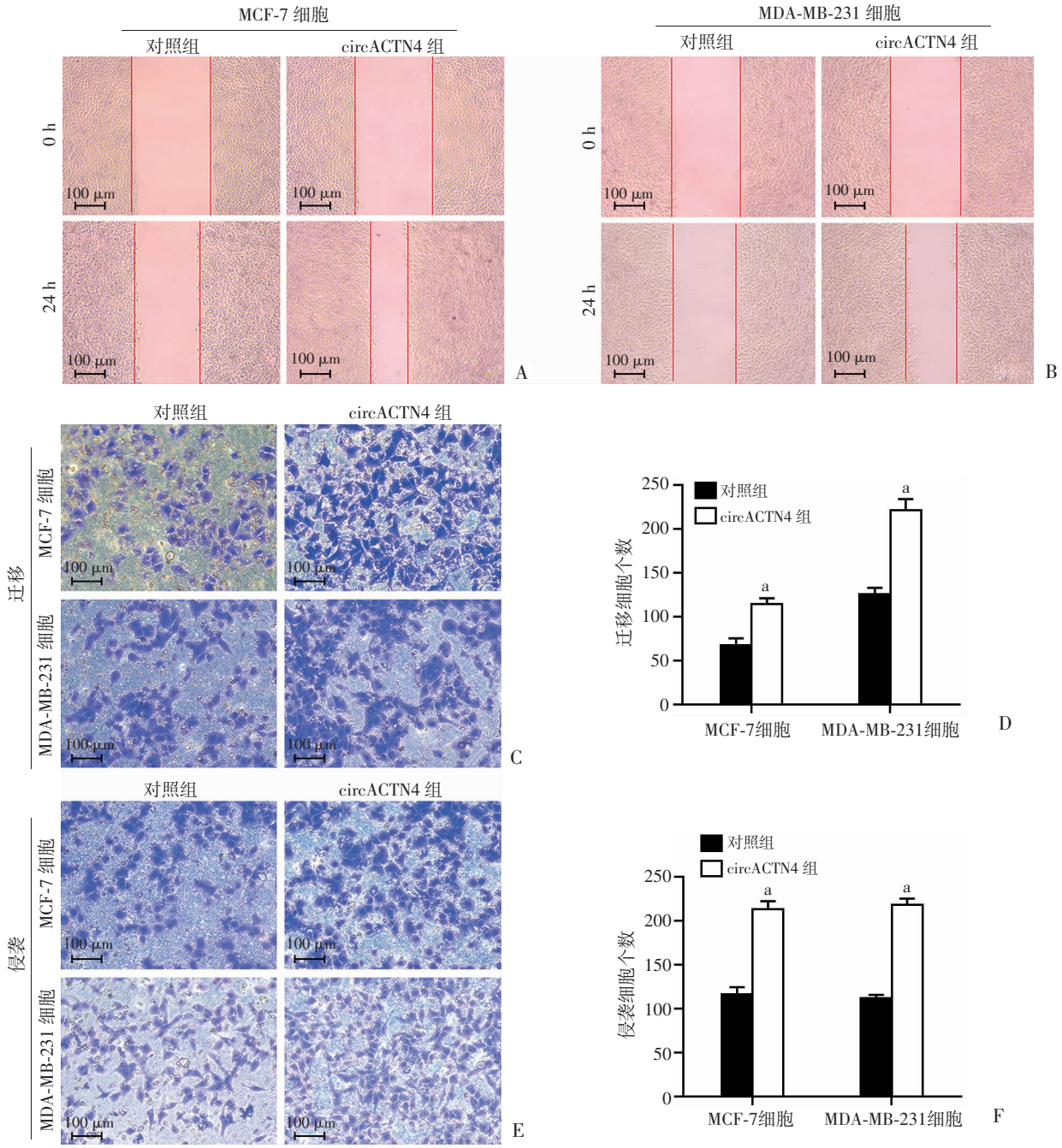
2.3 上调 circACTN4 增强乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力

采用细胞划痕实验、Transwell 小室迁移和侵袭实验检测乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。在细胞划痕实验中,MCF-7 细胞对照组 3 个视野细胞的相对迁移率为 1.056±0.107,circACTN4 组的相对迁移率为 2.483±0.086,与对照组相比,细胞的相对迁移率增加 1.42 倍($P<0.01$,图 4A);MDA-MB-231 细胞对照组 3 个视野细胞的相对迁移率为 0.973±0.089,circACTN4 组的相

对迁移率为2.386±0.265,与对照组相比,相对迁移率增加1.41倍($P<0.01$,图4B)。在Transwell小室迁移实验中,与对照组相比,circACTN4组的迁移细胞个数明显增加($P<0.01$,图4C、D)。在Transwell小室侵袭实验中,与对照组相比,circACTN4组的侵袭细胞个数明显增加($P<0.01$,图4E,F)。

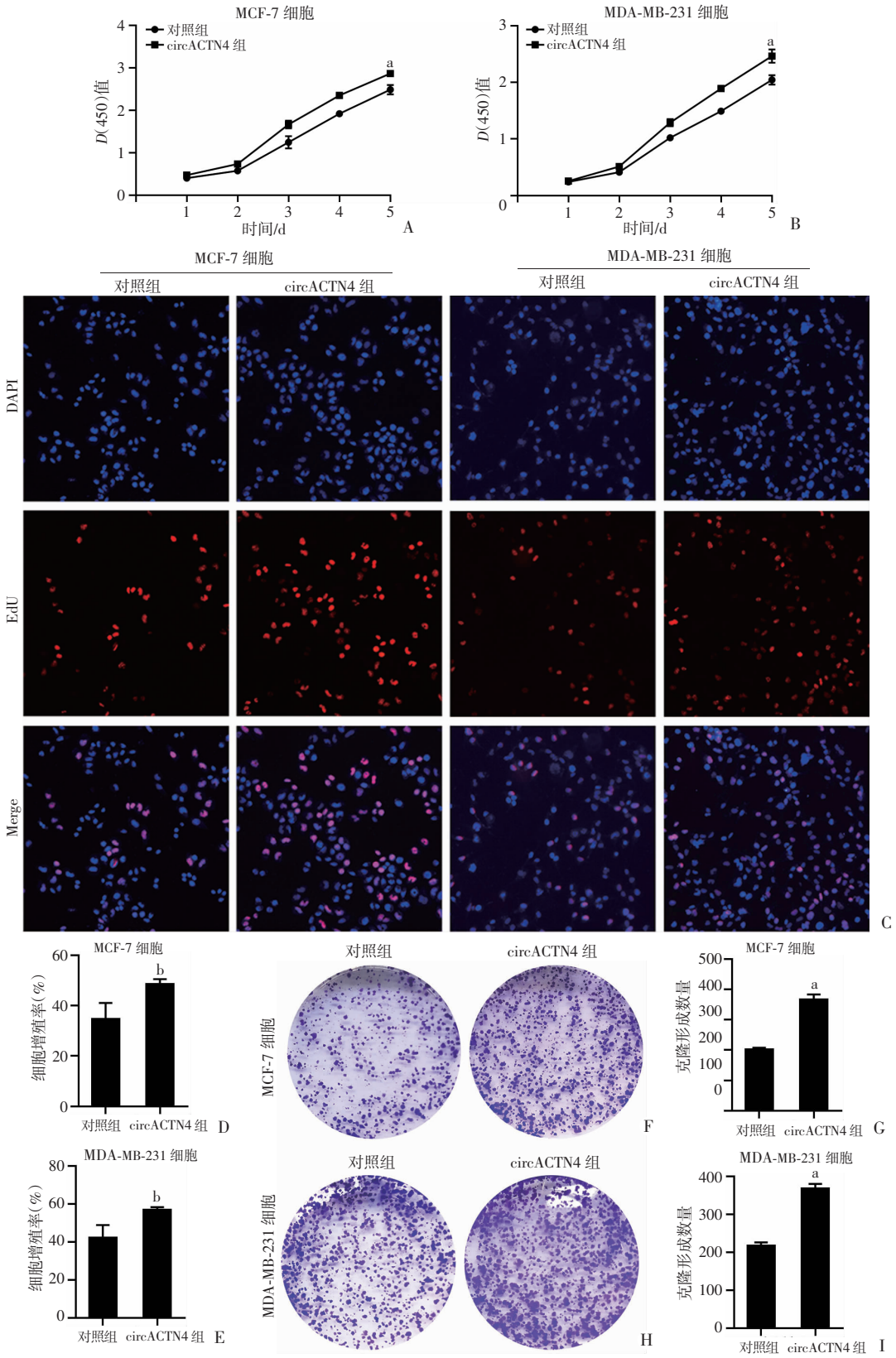
2.4　上调circACTN4增强乳腺癌细胞的增殖能力

采用CCK-8实验、EdU实验和克隆形成实验检测乳腺癌细胞的增殖能力。在CCK-8实验中,培养96 h,与对照组相比,circACTN4组细胞在450 nm处光密度值明显升高($P<0.01$,图5A、B)。在EdU实验中,与对照组相比,circACTN4组细胞增殖活性增强($P<0.05$,图5C~E)。在平板克隆实验中,MCF-7、MDA-MB-231细胞circACTN4组比对照组的克隆形成能力明显提高($P<0.01$,图5F~I)。



A:MCF-7细胞划痕实验;B:MDA-MB-231细胞划痕实验;C:Transwell小室迁移实验;D:迁移细胞个数比较a:$P<0.01$,与对照组比较;E:Transwell小室侵袭实验;F:侵袭细胞个数比较　a:$P<0.01$,与对照组比较

图4　过表达circACTN4对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

A:MCF-7 细胞 CCK-8 实验;B:MDA-MB-231 细胞 CCK-8 实验;C:EdU 实验检测细胞增殖(×100);D:MCF-7 细胞增殖率;E:MDA-MB-231 细胞增殖率;F:MCF-7 细胞克隆形成实验;G:MCF-7 细胞克隆形成数量分析;H:MDA-MB-231 细胞克隆形成实验;I:MDA-MB-231 细胞克隆形成数量分析

图 5 过表达 circACTN4 对乳腺癌细胞增殖能力的影响

2.5　circACTN4 促进体内肿瘤发生及转移

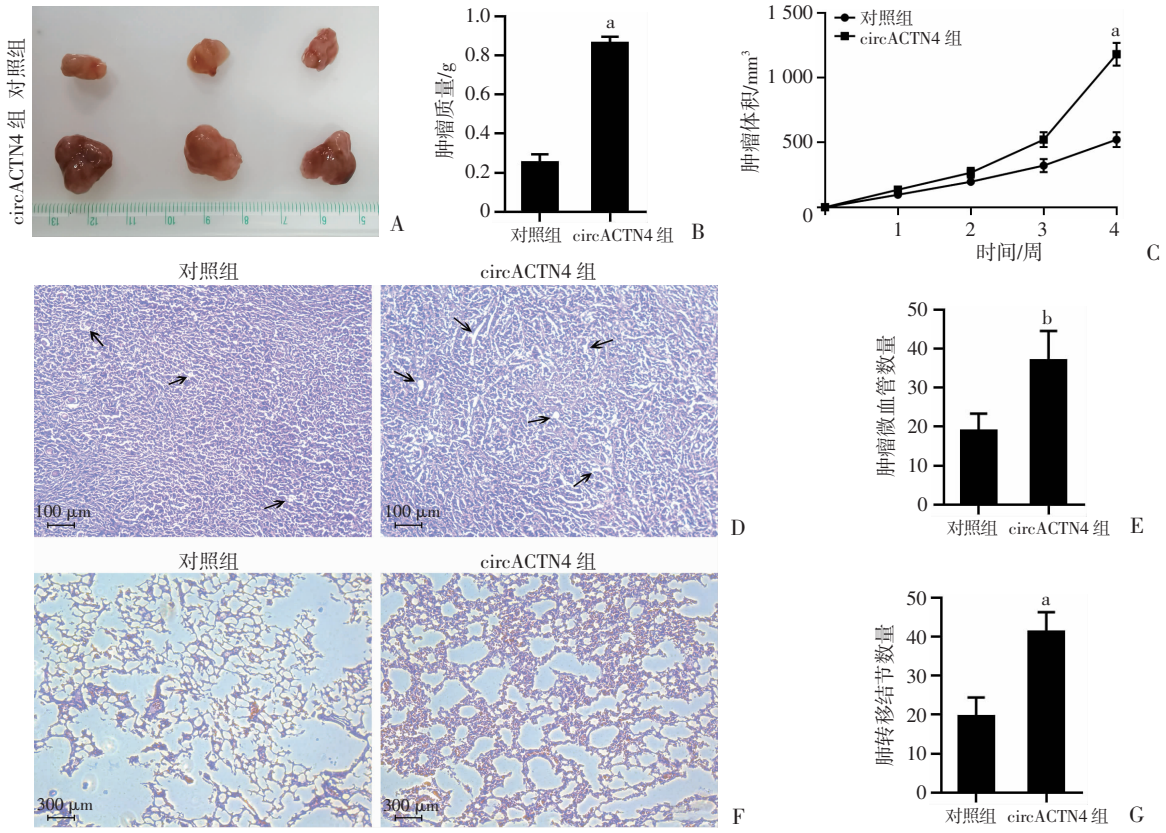
为了探究 circACTN4 在体内对肿瘤生长与转移的影响,将 circACTN4 稳定过表达的三阴乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 及其对应的对照组细胞株分别接种到雌性裸鼠皮下,成功构建了裸鼠移植瘤生长转移模型。与对照组相比,circACTN4 过表达组的肿瘤体积和质量显著高于对照组($P<0.01$,图 6A、B)。通过肿瘤生长曲线发现:circACTN4 组体内肿瘤生长速度明显快于对照组($P<0.01$,图 6C)。与对照组相比,circACTN4 组的肿瘤微血管密度显著增加($P<0.05$,图 6D、E),过表达 circACTN4 可显著促进肿瘤微血管的形成。与对照组相比,circACTN4 组肺转移结节数量增多($P<0.01$,图 6F、G),过表达 circACTN4 可促进肿瘤的自发性肺转移。

2.6　circACTN4 调节细胞周期相关蛋白的表达

MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞转染 48 h 后进行总蛋白提取,采用 Western blot 检测乳腺癌细胞中细胞周期相关蛋白的表达。结果显示:过表达 circACTN4 后,CCND1、CCND2 和 CDK4 的蛋白表达显著提高($P<0.01$,图 7A~C)。用免疫组化检测移植瘤组织中细胞周期相关蛋白 CCND1、CCND2 和 CDK4 的表达,结果进一步表明:过表达 circACTN4 可上调 CCND1、CCND2 和 CDK4 的表达(图 7D)。

3　讨论

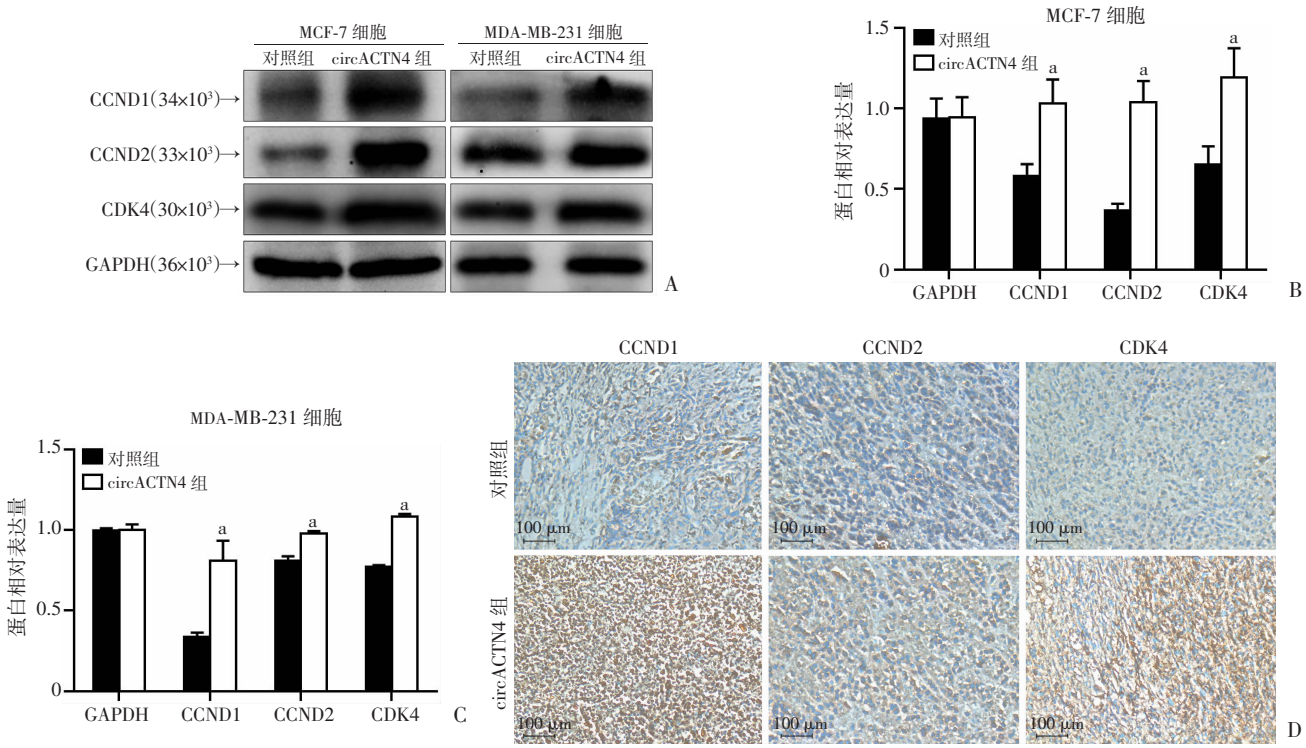
CircRNA 的主要生物学功能包括充当 microRNA 海绵、与 RNA 结合蛋白相互作用以及作为蛋白质翻译模板等[14]。circRNA 分子在细胞中起到 miRNA 海绵的作用,进而解除 miRNA 对靶基因的抑制作用,提高靶基因的表达水平,这一作用被称为竞争性内源 RNA 机制(ceRNA)[15]。例如,人类细胞系中 CircRNA-CDR1as 可以作为 miR-7 的海绵并发挥 ceRNA 作用[16]。此外,circRNA 可以与 RNA 结合蛋白结合形成 RNA 蛋白复合物,调控 RNA 以及 RNA 结合蛋白之间的相互作用,如 circMBL 可以与 MBL 基因表达的 MBL 蛋白结合,从而抑制 MBL 蛋白的活性[17]。虽然 circRNA 传统上被定义为一种非编码 RNA,但近来发现一些 circRNA 可以通过内部核糖体进入位点和 5′UTR 中的 N6-甲基腺苷启动蛋白编码功能[18]。更重要的是:circRNA 编码形成的蛋白质具有丰富的生物学



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

A:裸鼠移植瘤大体观察;B:肿瘤质量;C:每周测量肿瘤体积所得的肿瘤生长曲线;D、E:裸鼠肿瘤的 HE 染色观察及肿瘤微血管数量　箭头示微血管;F、G:裸鼠肺的 HE 染色观察及肺转移结节数量

图 6　circACTN4 促进移植瘤的生长与转移



a:$P<0.01$,与对照组比较

A:Western blot 检测;B:MCF-7 细胞周期相关蛋白相对表达量;C:MDA-MB-231 细胞周期相关蛋白相对表达量;D:免疫组化检测移植瘤组织中细胞周期相关蛋白的表达

图 7 上调 circACTN4 促进乳腺癌细胞周期相关蛋白的表达

功能,如 circPPP1R12A-73aa 和 circPPP1R12A-73a 通过激活 Hippo-YAP 信号通路增强结肠癌的增殖和转移[19]。

在本研究中,通过 circRNA 芯片对 4 对人类乳腺癌组织和癌旁组织进行表达谱的初步筛选,发现 circRNA circACTN4 在乳腺癌组织和细胞中呈现最明显的表达上调。然后,利用 qRT-PCR 对 40 对人类乳腺癌组织、癌旁组织及正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的 circACTN4 相对表达量进行验证,结果显示:与癌旁组织和正常乳腺上皮细胞相比,circACTN4 在乳腺癌组织以及乳腺癌细胞中的相对表达量显著上调,且 circACTN4 表达的增加与乳腺癌患者分期密切相关。此外,本研究还构建 circACTN4 的过表达质粒及对照质粒对上述结果进行进一步验证,结果显示:经空载质粒和 circACTN4 过表达质粒转染的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的 circACTN4 相对表达量显著提高,进一步证明 circACTN4 表达谱筛选的正确性。通过细胞划痕实验、Transwell 小室迁移和侵袭实验发现:过表达 circACTN4 后,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力明显增强;CCK-8 实验、EdU 实验和克隆形成实验显示:过表达 circACTN4 后,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的增殖能力明显增强;构建裸鼠移植瘤生长转移模型,发现 circACTN4 过表达组的肿瘤体积和质量显著高于对照组,肿瘤微血管密度显著增加,表明实体瘤的生长和转移具有血管生成依赖性[20]。本研究还发现过表达 circACTN4 能够促进肿瘤的自发性肺转移,促使转移结节的数量增多。另外,有研究发现 circACTN4 可直接与 c-myc 的启动子远端上游元件结合蛋白(FUBP1)竞争性结合,从而激活 MYC 的转录[21]。MYC 可通过调节细胞周期相关的基因促进细胞周期进程[22]。本研究 Western blot 实验和免疫组化实验证实:过表达 circACTN4 可在体内外促进乳腺癌细胞周期相关蛋白 CCND1、CCND2 和 CDK4 的表达。MYC 下游靶点 CCND1 和 CCND2 与 CDK4 或 CDK6 结合,对细胞周期 G_1/S 期的转换发挥至关重要作用[23]。上述实验可以充分证明 circACTN4 能够有效地促进乳腺癌的增殖、侵袭和转移。

综上所述,本研究发现 circACTN4 在乳腺癌组织以及乳腺癌细胞中显著上调表达,能够有效地促进乳腺癌的增殖、侵袭和转移,与乳腺癌的发生、发展密切相关。circACTN4 有望成为乳腺癌早期筛查与诊断的新型生物标志物、精准诊疗的新靶点。此外,本研究后

续将进一步扩大临床样本,深入探讨 circACTN4 在乳腺癌中的作用机制。

参考文献:

[1] HEER E, HARPER A, ESCANDOR N, *et al*. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study[J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(8): e1027-e1037. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30215-1.

[2] ZHAO Z J, SHEN J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer[J]. RNA Biol, 2017, 14(5): 514-521. DOI: 10.1080/15476286.2015.1122162.

[3] LI Z H, CHEN Z H, HU G H, *et al*. Roles of circular RNA in breast cancer: present and future[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 3945-3954.

[4] LI Z Y, HUANG C, BAO C, *et al*. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264. DOI: 10.1038/nsmb.2959.

[5] ARNAIZ E, SOLE C, MANTEROLA L, *et al*. CircRNAs and cancer: biomarkers and master regulators[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 90-99. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.12.002.

[6] HE R F, LIU P, XIE X M, *et al*. circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 145. DOI: 10.1186/s13046-017-0614-1.

[7] PATOP I L, WÜST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs[J]. EMBO J, 2019, 38(16): e100836. DOI: 10.15252/embj.2018100836.

[8] VO J N, CIESLIK M, ZHANG Y J, *et al*. The landscape of circular RNA in cancer[J]. Cell, 2019, 176(4): 869-881.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.021.

[9] ZENG K X, HE B S, YANG B B, *et al*. The pro-metastasis effect of circANKS1B in breast cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 160. DOI: 10.1186/s12943-018-0914-x.

[10] CAO L L, WANG M, DONG Y J, *et al*. Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1α/HK_2[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 145. DOI: 10.1038/s41419-020-2336-0.

[11] QU S B, LIU Z C, YANG X S, *et al*. The emerging functions and roles of circular RNAs in cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 414: 301-309. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.022.

[12] JACKY LAM W K, DENNIS LO Y M. Circular RNAs as urinary biomarkers[J]. Clin Chem, 2019, 65(10): 1196-1198. DOI: 10.1373/clinchem.2019.309773.

[13] WANG X S, XING L, YANG R, *et al*. The circ$ACTN_4$ interacts with $FUBP_1$ to promote tumorigenesis and progression of breast cancer by regulating the expression of proto-oncogene MYC[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 91. DOI: 10.1186/s12943-021-01383-x.

[14] WILUSZ J E. A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9(4): e1478. DOI: 10.1002/wrna.1478.

[15] 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): 675-691. DOI: 10.1038/s41576-019-0158-7.

[16] JIANG C H, ZENG X H, SHAN R F, *et al*. The emerging picture of the roles of CircRNA-CDR1as in cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 590478. DOI: 10.3389/fcell.2020.590478.

[17] PAMUDURTI N R, BARTOK O, JENS M, *et al*. Translation of circRNAs[J]. Mol Cell, 2017, 66(1): 9-21.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.021.

[18] LEI M, ZHENG G T, NING Q Q, *et al*. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 30. DOI: 10.1186/s12943-020-1135-7.

[19] ZHENG X, CHEN L, ZHOU Y, *et al*. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer *via* Hippo-YAP signaling[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 47. DOI: 10.1186/s12943-019-1010-6.

[20] DE PALMA M, BIZIATO D, PETROVA T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(8): 457-474. DOI: 10.1038/nrc.2017.51.

[21] WANG X, XING L, YANG R, *et al*. The circ$ACTN_4$ interacts with $FUBP_1$ to promote tumorigenesis and progression of breast cancer by regulating the expression of proto-oncogene MYC[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 91. DOI: 10.1186/s12943-021-01383-x.

[22] WANG C, YANG Y, ZHANG G, *et al*. Long noncoding RNA EMS connects c-Myc to cell cycle control and tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(29): 14620-14629. DOI: 10.1073/pnas.1903432116.

[23] HAHM E R, SINGH K B, SINGH S V. C-Myc is a novel target of cell cycle arrest by honokiol in prostate cancer cells[J]. Cell Cycle, 2016, 15(17): 2309-2320. DOI: 10.1080/15384101.2016.1201253.

(**收稿**:2021-09-28;**修回**:2021-11-07)

(编辑 张 维)