

circRNA TCF25靶向miR-128b对人乳腺癌细胞MCF-7增殖和凋亡的影响

夏书官, 王声, 任阳光, 田艳艳, 左永刚
(河南大学淮河医院甲状腺乳腺外科, 河南 开封 475000)

摘要 **目的** 探究环状RNA (circRNA) 转录因子25 (TCF25) 靶向微RNA-128b (miR-128b) 对人乳腺癌细胞MCF-7增殖和凋亡的影响。**方法** 收集人乳腺癌细胞MCF-7培养至对数生长期, 将MCF-7细胞随机分为空白组 (未转染)、si-NC组 (转染si-NC)、si-circRNA TCF25组 (转染si-circRNA TCF25)、pcDNA-circRNA TCF25组 (转染pcDNA-circRNA TCF25)、miR-NC组 (转染miR-NC)、miR-128b mimic组 (转染miR-128b模拟物)、miR-128b inhibitor组 (转染miR-128b抑制剂)、pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组 (转染pcDNA-circRNA TCF25和miR-128b模拟物), 每组6个复孔。转染48 h后, 荧光定量PCR (RT-qPCR) 检测各组细胞中circRNA TCF25、miR-128b表达; RNase R酶消化实验进行环状RNA鉴定; 核浆分离法检测circRNA TCF25的亚细胞定位; 噻唑蓝 (MTT) 实验检测细胞增殖活力; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; RT-qPCR检测磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (PTEN)、细胞增殖核抗原-67 (Ki-67)、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3 (caspase-3) mRNA表达; Western blotting检测PTEN、Ki-67、caspase-3、活化的caspase-3蛋白表达; 双荧光素酶报告实验分析circRNA TCF25与miR-128b的靶向关系。**结果** 与对照组比较, circRNA TCF25的相对表达量在RNase R酶处理后并无显著变化 ($P > 0.05$), 而线性TCF25的相对表达量在经RNase R酶处理后降低 ($P < 0.05$); circRNA TCF25在胞质中的相对表达量高于细胞核 ($P < 0.05$)。与空白组和si-NC组比较, si-circRNA TCF25组细胞增殖活力降低, 凋亡率升高, Ki-67 mRNA及蛋白表达降低, PTEN、caspase-3、活化的caspase-3 mRNA及蛋白表达升高; pcDNA-circRNA TCF25组细胞增殖活力升高, 凋亡率降低, Ki-67 mRNA及蛋白表达升高, PTEN、caspase-3、活化的caspase-3 mRNA及蛋白表达降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与空白组和miR-NC组比较, miR-128b mimic组细胞增殖活力降低, 凋亡率升高, Ki-67 mRNA及蛋白表达降低, PTEN、caspase-3、活化的caspase-3 mRNA及蛋白表达升高, miR-128b inhibitor组细胞增殖活力升高, 凋亡率降低, Ki-67 mRNA及蛋白表达升高, PTEN、caspase-3、活化的caspase-3 mRNA及蛋白表达降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与pcDNA-circRNA TCF25组比较, pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞增殖活力降低, 凋亡率升高, Ki-67 mRNA及蛋白表达降低, PTEN、caspase-3、活化的caspase-3 mRNA及蛋白表达升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶实验结果证实了circRNA TCF25可靶向调控miR-128b。**结论** circRNA TCF25可能通过靶向抑制miR-128b表达, 促进Ki-67表达, 抑制PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达, 发挥促进人乳腺癌细胞MCF-7增殖, 抑制其凋亡的作用。

关键词 环状RNA转录因子25; 微RNA-128b; 乳腺癌; 增殖; 凋亡

中图分类号 R737.9 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)03-0198-09

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240229.1654.016>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.03.002

Effect of circular RNA transcription factor 25-targeting microRNA-128b on the proliferation and apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells

XIA Shuguan, WANG Sheng, REN Yangguang, TIAN Yanyan, ZUO Yonggang
(Department of Thyroid and Breast Surgery, Henan University Huaihe Hospital, Kaifeng 475000, China)

Abstract **Objective** To explore the effect of circular RNA (circRNA) transcription factor 25 (TCF25) -targeting microRNA-128b (miR-128b) on the proliferation and apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. **Methods** MCF-7 cells were cultured until the logarithmic growth stage. Cells were randomly divided into the blank (untransfected), si-NC (transfected si-NC), si-circRNA TCF25 (transfected si-circRNA TCF25), pcDNA-circRNA TCF25 (transfected pcDNA-circRNA TCF25), miR-NC (transfected miR-NC), miR-128b mimic (transfected miR-128b mimic), miR-128b inhibitor (transfected miR-128b inhibitor), and pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic (transfected with pcDNA-circRNA TCF25 and miR-128b mimic) groups. Each group included six multiple pores. Forty-eight hours after transfection, the expression of circRNA TCF25 and miR-128b in each group was determined using real-time reverse transcription-quantitative

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20210579)

作者简介: 夏书官 (1986-), 男, 主治医师, 硕士研究生。

通信作者: 夏书官, E-mail: stq9zv@163.com

收稿日期: 2023-04-19

网络出版时间: 2024-03-05 15:43:14

tative polymerase chain reaction (RT-qPCR). An RNase R enzyme digestion assay was used to identify circular RNA. Subcellular localization of circRNA TCF25 was determined through cytoplasmic-nuclear separation. Cell proliferative activity was measured using the 2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Apoptosis was detected using flow cytometry. RT-qPCR was performed to determine the mRNA expression levels of phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), proliferating nuclear antigen 67 (*Ki-67*), and *caspase-3*. Western blotting was performed to measure *PTEN*, *Ki-67*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* protein expression. The dual-luciferase reporter (DLR) assay was performed to analyze the relationship between circRNA TCF25 and miR-128b. **Results** Compared to the control group, the relative expression of circRNA TCF25 did not exhibit significant changes after RNase R enzyme treatment ($P > 0.05$), whereas that of linear TCF25 decreased after RNase R enzyme treatment ($P < 0.05$). The relative expression of circRNA TCF25 in the cytoplasm was higher than that in the nucleus ($P < 0.05$). Compared with the blank and si-NC groups, the cell proliferation activity of the si-circRNA TCF25 group decreased; the apoptosis rate increased; *Ki-67* mRNA and protein expression decreased; and *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* mRNA and protein expression increased. In addition, cell proliferation activity increased and apoptosis rate decreased in the pcDNA-circRNA TCF25 group. *Ki-67* mRNA and protein expression were increased, and *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* mRNA and protein expression decreased, with statistical significance (all $P < 0.05$). Compared with the blank and miR-NC groups, the cell proliferation activity of the miR-128b mimic group decreased; the apoptosis rate increased; *Ki-67* mRNA and protein expression decreased; and *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* mRNA and protein expression were increased, whereas the cell proliferation activity increased and apoptosis rate decreased in the miR-128b inhibitor group. *Ki-67* mRNA and protein expression were increased, and *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* mRNA and protein expression decreased, with statistical significance (all $P < 0.05$). Compared with the pcDNA circRNA TCF25 group, the cell proliferation activity of the pcDNA circRNA TCF25+miR-128b mimic group decreased; the apoptosis rate increased; *Ki-67* mRNA and protein expression decreased; and *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* mRNA and protein expression increased, with statistical significance (all $P < 0.05$). The DLR assay results confirmed that circRNA TCF25 targets miR-128b. **Conclusion** CircRNAs may play a key role in promoting the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and inhibiting their apoptosis by targeting miR-128b expression; promoting *Ki-67* expression; and inhibiting *PTEN*, *caspase-3*, and cleaved *caspase-3* expression.

Keywords circular RNA transcription factor 25; microRNA-128b; breast cancer; proliferation; apoptosis

全球癌症统计报告^[1]数据显示,2020年女性乳腺癌新发病例达230万,约占新发癌症病例的11.7%,已超越肺癌居全球第一位;乳腺癌也是导致女性癌症死亡的主要原因。虽然近年来手术、放化疗、免疫治疗、靶向治疗及内分泌治疗等手段在乳腺癌治疗中取得重要进展,但仍有部分患者在治疗后出现复发、转移甚至死亡,对女性健康造成严重危害。因此,探究乳腺癌发生发展的分子机制、寻找新的分子靶点对乳腺癌的诊断治疗及预后改善有重要意义。环状RNA (circular RNA, circRNA) 是一类通过外显子或内含子序列可变剪接形成的单链闭合环状RNA分子,可充当微RNA (microRNA, miR) 的分子海绵竞争性结合miR,进而改变靶mRNA表达状态^[2]。最新研究^[3]表明, circRNA在乳腺癌的发生发展过程中发挥重要调控作用,并可调节乳腺癌细胞增殖、凋亡和转移等生物学过程。YIN等^[4]通过体外细胞实验发现,过表达circRNA转录因子25 (transcription factor 25, TCF25) 可作为miR-206的海绵促进胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力。陈旭轮等^[5]研究显示, circRNA TCF25可通过靶向miR-128提高膀

胱癌细胞生长增殖、迁移和侵袭能力。已有研究^[6]显示,过表达miR-128可通过调节磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*) 来增强乳腺癌细胞对阿霉素的敏感性。然而关于circRNA TCF25对乳腺癌细胞增殖、凋亡影响的研究尚未见报道。本研究通过体外实验探究circRNA TCF25靶向miR-128b对人乳腺癌细胞MCF-7增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞:人乳腺癌细胞MCF-7 (美国ATCC细胞库,货号YBCC100943)。

1.1.2 药物与试剂:si-NC、si-circRNA TCF25、pcDNA-circRNA TCF25、miR-NC、miR-128b模拟物、miR-128b抑制剂、双荧光素酶报告载体均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成。Lipofectamine 2000转染试剂盒(美国Invitrogen公司,货号11668019),RNase R酶(上海抚生实业有限公司,货号A-PJ1136),细胞核/细胞质细胞组分提取试剂盒(美国Biovision公司,货号

K266-25), 噻唑蓝 (MTT) 细胞增殖检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号M1020), 凋亡检测试剂盒 (美国Biogems公司, 货号62700-50), TRIzol总核糖核酸 (RNA) 提取试剂盒 (上海联迈生物工程有限公司, 货号LM80901B), 反转录试剂盒 (日本TaKaRa公司, 货号RR036A), 荧光定量PCR试剂盒 (日本TaKaRa公司, 货号RR420A), 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (美国AAT Bioquest公司, 货号200619), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号D0010), 兔抗人PTEN、细胞增殖核抗原-67 (Ki-67)、caspase-3、活化的caspase-3、U6、 β -actin单克隆抗体 (美国Abcam公司, 货号ab13847、ab34710、ab69949、ab26548、ab16105、ab22140), 羊抗兔PTEN、Ki-67、caspase-3、活化的caspase-3、U6、 β -actin多克隆抗体 (美国Abcam公司, 货号ab34106、ab22693、ab51102、ab20247、ab16419、ab10188)。

1.1.3 实验器材: S1000™ 384 Well型PCR仪 (美国BIO-RAD公司), SuPerMax 3000AL型型多功能酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司), Attune CytPix型流式细胞仪 (美国Invitrogen公司), BPN-CRH型细胞培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司), DT-MINIE-135型电泳仪 [德诺杰亿 (北京) 生物科技有限公司], JP-2880型凝胶成像系统 (上海金鹏分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组: 将人乳腺癌细胞MCF-7于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中常规培养, 每2 d换液1次。待细胞生长至对数生长期, 消化并离心收集细胞, 按照 1.0×10^4 /孔接种至96孔板。根据Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书分别将si-NC、si-circRNA TCF25、pcDNA-circRNA TCF25、miR-NC、miR-128b模拟物、miR-128b抑制剂、pcDNA-circRNA TCF25和miR-128b模拟物转染至上述细胞, 分别记作si-NC组、si-circRNA TCF25组、pcDNA-circRNA TCF25组、miR-NC组、miR-128b mimic组、miR-128b inhibitor组和pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组, 另取未转染人乳腺癌细胞MCF-7设为空白组, 每组6个复孔。

1.2.2 细胞中circRNA TCF25、miR-128b表达: 转染48 h后, 通过TRIzol总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA), 根据PCR试剂盒说明操作步骤检测circRNA TCF25、miR-128b

相对表达量。反应体系: 正向、反向引物各1 μ L, Real-Time Master Mix 10 μ L, cDNA 2 μ L, 无酶双蒸水 (RNase ddH₂O) 补足体系至20 μ L。反应条件: 95 °C预变性2 min, 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 72 °C延伸30 s (循环40次)。circRNA TCF25, 正向5'-TGAACCGATACGACAGTCC-3', 反向5'-ACGGGCATATATTACGTC-3', 产物长度146 bp; miR-128b, 正向5'-AGCCACATATCAGCACTT-3', 反向5'-CTTAGCATTTGAGTATATCTG-3', 产物长度206 bp; U6, 正向5'-ACCGATCAGATACGAG-3', 反向5'-TGCAAACGAGTTGACGTAGT-3', 产物长度177 bp; β -actin, 正向5'-GCACTAGCAGAGATCC-3', 反向5'-CATTGCACTGTCTAGTA-3', 产物长度306 bp。引物均由宝生物工程 (大连) 有限公司设计合成。circRNA TCF25以 β -actin为内参, miR-128b以U6为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量。

1.2.3 RNase R酶消化实验进行circRNA鉴定: 提取细胞总RNA后, 将pcDNA-circRNA TCF25组分为RNase R组 (加RNase R) 和对照组 (不加RNase R), 逆转录后进行荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 反应, 分别检测circRNA TCF25及其线性亲本基因TCF25在人乳腺癌细胞MCF-7中的表达水平, 明确circRNA TCF25在人乳腺癌MCF-7细胞中的结构稳定性。其中, MCF-7正向5'-TGGCAGATCACGTAC-3', 反向5'-AATGCCCGATATTGAGAGTCGTA-3', 产物长度187 bp。circRNA TCF25和 β -actin引物及反应条件同1.2.2。

1.2.4 核浆分离法检测circRNA TCF25的亚细胞定位: 根据细胞核/细胞质细胞组分提取试剂盒的说明书进行操作, 对pcDNA-circRNA TCF25组人乳腺癌MCF-7细胞进行核质分离。分别提取细胞质及细胞核RNA, 将其逆转录成cDNA, 以 β -actin为内参, 采用RT-qPCR检测circRNA TCF25分别在细胞质及细胞核中相对表达量, circRNA TCF25和 β -actin引物及反应条件同1.2.2。

1.2.5 细胞增殖活力检测: 将各组细胞按照 1.0×10^4 /孔接种至96孔板上, 分别在0、24、48、72 h时每孔加入20 μ L MTT溶液 (5 g/L) 继续孵育4 h, 吸弃孔内上清液, 每孔加入150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO) 充分震荡溶解结晶物, 通过多功能酶标仪检测490 nm处各孔的光密度 (optical density, OD) 值, 以OD_{490 nm}值代表

细胞增殖活力。

1.2.6 细胞凋亡检测:收集各组细胞,加入0.01%的胰酶消化制成 1.0×10^4 /mL的单细胞悬液。加入磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞,离心收集细胞,加入500 μ L结合缓冲液制成单细胞悬液,分别加入5 μ L的Annexin V-FITC和PI溶液室温下孵育10 min。于1 h内应用流式细胞仪检测,通过CELL Quest软件分析细胞凋亡率。

1.2.7 *PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3* mRNA表达检测:收集各组MCF-7细胞,采用RT-qPCR检测*PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3* mRNA表达,方法同1.2.2。其中,*PTEN*正向5'-AGACGGAGAGGATGAATGTGC-3',反向5'-AACCGCGATTCTCAATGCT-3',产物长度344 bp;*Ki-67*正向5'-ACCGTAGGTACAGTT-3',反向5'-GTCAAGCAGAGCATT-3',产物长度139 bp;*caspase-3*正向5'-TGCAATATGCAGATAC-3',反向5'-CCGATAAGTACGATTAG-3',产物长度266 bp; *β -actin*正向5'-TGACCACGATACGAGC-3',反向5'-CGACGAGGATACGATCG-3',产物长度145 bp。引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成。

1.2.8 *PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达检测

收集各组细胞,加入RIPA细胞裂解液裂解提取细胞总蛋白,通过BCA法进行蛋白定量。100 $^{\circ}$ C沸水浴10 min。将蛋白样品按照30 μ g/孔上样,电泳分离并转膜到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入*PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*、 *β -actin*一抗(1 : 1 000)4 $^{\circ}$ C培养过夜。次日加入相应二抗(1 : 5 000)室温孵育2 h。滴加化学发光试剂(ECL),显影曝光,JP-2880凝胶成像系统成像,以 *β -actin*为内参,应用Image J软件对蛋白条带进行定量分析。

1.2.9 circRNA TCF25与miR-128b的靶向关系分析

通过TargetScan数据库(https://www.targetscan.org/vert_80/)预测circRNA TCF25的靶基因。采用脂质体转染法将WT circRNA TCF25、MUT circRNA TCF25荧光素酶报告载体分别与miR-128b模拟物、miR-NC共转染至人乳腺癌MCF-7细胞。常规培养48 h后,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测miR-128b mimics组和miR-NC组细胞中circRNA TCF25荧光素酶相对活性。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞circRNA TCF25、miR-128b表达比较

与空白组和si-NC组比,si-circRNA TCF25组细胞circRNA TCF25表达降低,miR-128b表达升高;pcDNA-circRNA TCF25组细胞circRNA TCF25表达升高,miR-128b表达降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与空白组和miR-NC组比,miR-128b mimic组细胞circRNA TCF25表达降低,miR-128b表达升高;miR-128b inhibitor组细胞circRNA TCF25表达升高,miR-128b表达降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与pcDNA-circRNA TCF25组比较,pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞circRNA TCF25表达降低,miR-128b表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表1。

2.2 circRNA TCF25的鉴定及其亚细胞定位

与对照组比较,Rnase R组circRNA TCF25相对表达量无统计学差异($P > 0.05$),而*TCF25* mRNA相对表达量下降($P < 0.05$),见表2。核质分离实验显示,人乳腺癌MCF-7细胞中circRNA TCF25在胞质中的相对表达量(1.65 ± 0.28)高于其在细胞核中的相对表达量(0.61 ± 0.10 , $P < 0.05$)。

2.3 各组细胞增殖活力比较

在24 h、48 h、72 h 3个时间点,与空白组和si-NC组比较,si-circRNA TCF25组细胞增殖活力降低,pcDNA-circRNA TCF25组细胞增殖活力升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与空白组和miR-NC组比较,miR-128b mimic组细胞增殖活力降低,miR-128b inhibitor组细胞增殖活力升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与pcDNA-circRNA TCF25组比较,pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞增殖活力降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图1。

2.4 各组细胞凋亡情况比较

空白组、si-NC组、si-circRNA TCF25组、pcDNA-circRNA TCF25组、miR-NC组、miR-128b mimic组、

表1 各组细胞circRNA TCF25、miR-128b表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of circRNA TCF25 and miR-128b expression in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	circRNA TCF25	miR-128b
Blank group	6	1.02 ± 0.20	1.00 ± 0.19
si-NC group	6	0.99 ± 0.19	1.01 ± 0.18
si-circRNA TCF25 group	6	0.52 ± 0.09 ^{1,2)}	1.35 ± 0.24 ^{1,2)}
pcDNA-circRNA TCF25 group	6	1.74 ± 0.31 ^{1,2)}	0.71 ± 0.12 ^{1,2)}
miR-NC group	6	1.00 ± 0.18	0.98 ± 0.17
miR-128b mimic group	6	0.66 ± 0.12 ^{1,3)}	1.93 ± 0.37 ^{1,3)}
miR-128b inhibitor group	6	1.42 ± 0.26 ^{1,3)}	0.45 ± 0.08 ^{1,3)}
pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic group	6	1.22 ± 0.20 ⁴⁾	1.17 ± 0.18 ⁴⁾

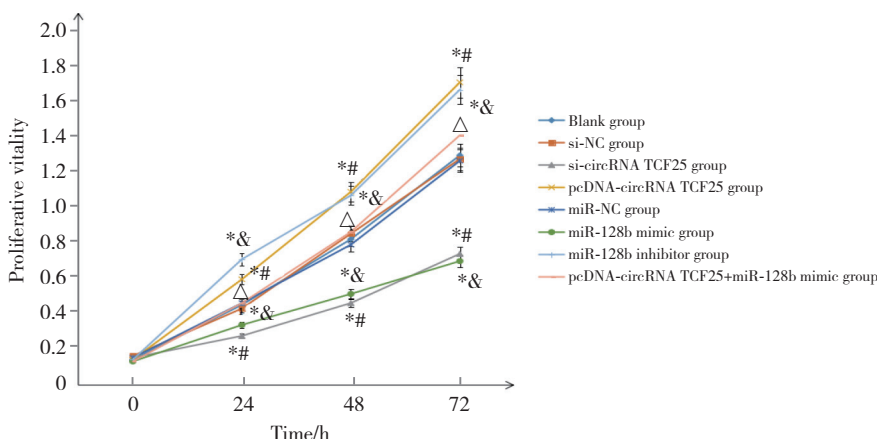
1) $P < 0.05$ vs. blank group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group; 3) $P < 0.05$ vs. miR-NC group; 4) $P < 0.05$ vs. pcDNA-circRNA TCF25 group.

表2 circRNA TCF25与TCF25 mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of circRNA TCF25 and TCF25 mRNA expression ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	circRNA TCF25	TCF25 mRNA
Control	6	1.04 ± 0.20	0.98 ± 0.19
RNase R	6	0.96 ± 0.18	0.22 ± 0.03 ¹⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group.



* $P < 0.05$ vs. blank group; # $P < 0.05$ vs. si-NC group; & $P < 0.05$ vs. miR-NC group; Δ $P < 0.05$ vs. pcDNA-circRNA TCF25 group.

图1 各组细胞增殖活力比较

Fig.1 Comparison of cell proliferation activity in each group

miR-128b inhibitor组、pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞凋亡率分别为(17.38 ± 2.16)%、(15.22 ± 2.67)%、(43.75 ± 7.98)%、(8.64 ± 1.19)%、(16.16 ± 2.51)%、(38.84 ± 7.43)%、(9.19 ± 1.46)%和(14.45 ± 2.19)%。与空白组和si-NC组比较, si-circRNA TCF25组细胞凋亡率升高, pcDNA-circRNA TCF25组细胞凋亡率降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白组和miR-NC组比较, miR-128b mimic组细胞凋亡率升高, miR-128b inhibitor组细胞凋亡率降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与

pcDNA-circRNA TCF25组比较, pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞凋亡率升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见图2。

2.5 各组细胞PTEN、Ki-67、caspase-3 mRNA表达比较

与空白组和si-NC组比较, si-circRNA TCF25组细胞Ki-67 mRNA表达降低, PTEN、caspase-3 mRNA表达升高, pcDNA-circRNA TCF25组细胞Ki-67 mRNA表达升高, PTEN、caspase-3 mRNA表达降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白组和miR-NC组

比较, miR-128b mimic组细胞Ki-67 mRNA表达降低, *PTEN*、*caspase-3* mRNA表达升高, miR-128b inhibitor组细胞Ki-67 mRNA表达升高, *PTEN*、*caspase-3* mRNA表达降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与

pcDNA-circRNA TCF25组比较, pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞Ki-67 mRNA表达降低, *PTEN*、*caspase-3* mRNA表达升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表3。

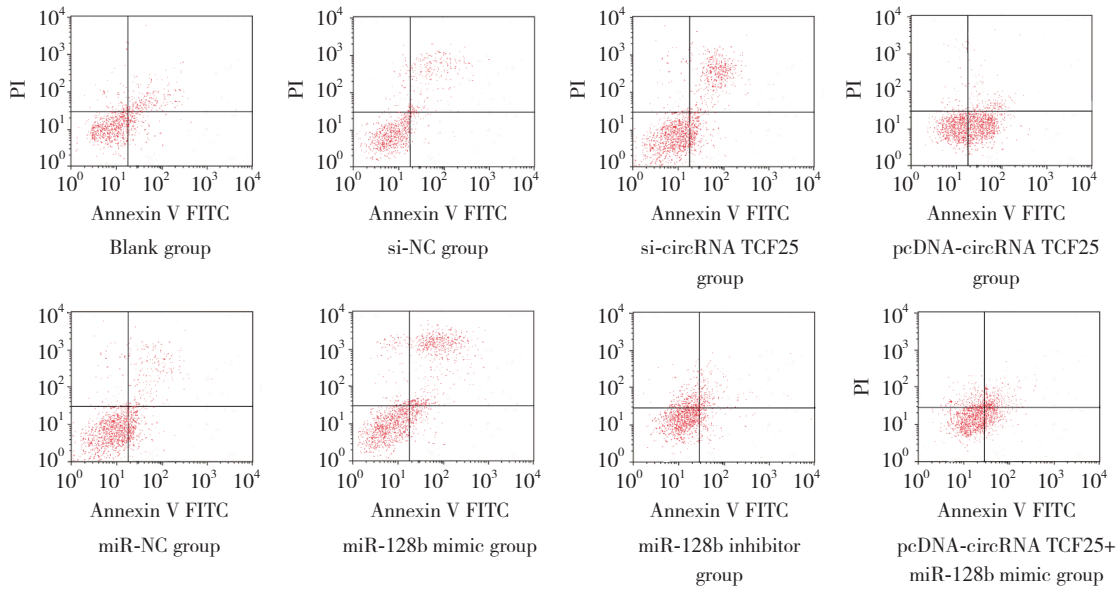


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig.2 Cell apoptosis rates in each group determined using flow cytometry

表3 各组细胞*PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3* mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of *PTEN*, *Ki-67*, and *caspase-3* mRNA expression in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	<i>PTEN</i> mRNA	<i>Ki-67</i> mRNA	<i>Caspase-3</i> mRNA
Blank group	6	0.99 ± 0.18	1.02 ± 0.20	0.97 ± 0.17
si-NC group	6	1.00 ± 0.19	0.98 ± 0.19	0.98 ± 0.18
si-circRNA TCF25 group	6	1.37 ± 0.22 ^{1),2)}	0.59 ± 0.10 ^{1),2)}	1.52 ± 0.28 ^{1),2)}
pcDNA-circRNA TCF25 group	6	0.62 ± 0.11 ^{1),2)}	1.45 ± 0.24 ^{1),2)}	0.73 ± 0.13 ^{1),2)}
miR-NC group	6	0.97 ± 0.16	1.00 ± 0.19	1.03 ± 0.20
miR-128b mimic group	6	1.41 ± 0.26 ^{1),3)}	0.67 ± 0.11 ^{1),3)}	1.49 ± 0.27 ^{1),3)}
miR-128b inhibitor group	6	0.75 ± 0.13 ^{1),3)}	1.64 ± 0.30 ^{1),3)}	0.54 ± 0.09 ^{1),3)}
pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic group	6	0.89 ± 0.15 ⁴⁾	1.14 ± 0.22 ⁴⁾	0.95 ± 0.17 ⁴⁾

1) $P < 0.05$ vs. blank group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group; 3) $P < 0.05$ vs. miR-NC group; 4) $P < 0.05$ vs. pcDNA-circRNA TCF25 group.

2.6 各组细胞*PTEN*、*Ki-67*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达比较

与空白组和si-NC组比较, si-circRNA TCF25组细胞Ki-67蛋白表达降低, *PTEN*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达升高; pcDNA-circRNA TCF25组细胞Ki-67蛋白表达升高, *PTEN*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与空白组和miR-NC组比较, miR-128b

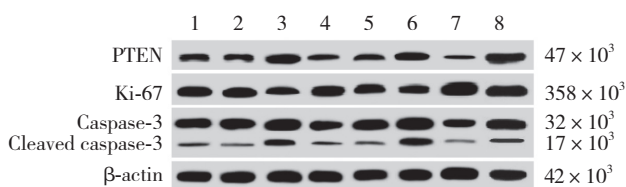
mimic组细胞Ki-67蛋白表达降低, *PTEN*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达升高; miR-128b inhibitor组细胞Ki-67蛋白表达升高, *PTEN*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与pcDNA-circRNA TCF25组比较, pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞Ki-67蛋白表达降低, *PTEN*、*caspase-3*、活化的*caspase-3*蛋白表达升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表4、图3。

表4 各组细胞PTEN、Ki-67、caspase-3、活化的caspase-3蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of PTEN, Ki-67, caspase-3, and cleaved caspase-3 protein expression in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PTEN	Ki-67	Caspase-3	Cleaved caspase-3
Blank group	6	0.55 ± 0.10	0.83 ± 0.15	0.62 ± 0.11	0.20 ± 0.03
si-NC group	6	0.52 ± 0.09	0.80 ± 0.14	0.58 ± 0.10	0.21 ± 0.04
si-circRNA TCF25 group	6	0.78 ± 0.13 ^{1),2)}	0.62 ± 0.11 ^{1),2)}	0.83 ± 0.15 ^{1),2)}	0.54 ± 0.09 ^{1),2)}
pcDNA-circRNA TCF25 group	6	0.42 ± 0.07 ^{1),2)}	1.09 ± 0.19 ^{1),2)}	0.45 ± 0.08 ^{1),2)}	0.11 ± 0.02 ^{1),2)}
miR-NC group	6	0.49 ± 0.08	0.85 ± 0.16	0.63 ± 0.12	0.23 ± 0.04
miR-128b mimic group	6	0.66 ± 0.12 ^{1),3)}	0.57 ± 0.10 ^{1),3)}	0.94 ± 0.16 ^{1),3)}	0.60 ± 0.11 ^{1),3)}
miR-128b inhibitor group	6	0.37 ± 0.06 ^{1),3)}	1.14 ± 0.21 ^{1),3)}	0.40 ± 0.07 ^{1),3)}	0.09 ± 0.01 ^{1),3)}
pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic group	6	0.59 ± 0.10 ⁴⁾	0.77 ± 0.13 ⁴⁾	0.68 ± 0.12 ⁴⁾	0.24 ± 0.04 ⁴⁾

1) $P < 0.05$ vs. blank group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group; 3) $P < 0.05$ vs. miR-NC group; 4) $P < 0.05$ vs. pcDNA-circRNA TCF25 group.



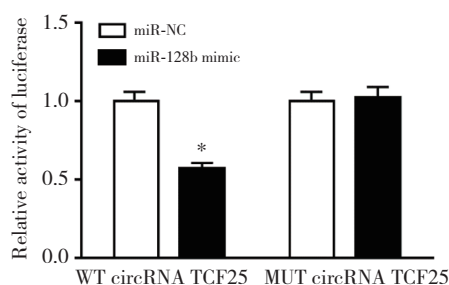
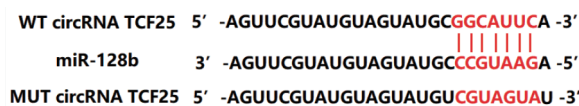
1, blank group; 2, si-NC group; 3, si-circRNA TCF25 group; 4, pcDNA-circRNA TCF25 group; 5, miR-NC group; 6, miR-128b mimic group; 7, miR-128b inhibitor group; 8, pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic group.

图3 各组细胞PTEN、Ki-67、caspase-3、活化的caspase-3蛋白表达

Fig.3 PTEN, Ki-67, caspase-3, and cleaved caspase-3 protein expression in each group

2.7 circRNA TCF25与miR-128b的靶向关系分析

TargetScan数据库分析发现,miR-128b与circRNA TCF25存在结合位点,提示miR-128b可能是circRNA TCF25的靶基因,见图4。在转染WT circRNA TCF25细胞中,miR-128b mimic组细胞相对荧光强度低于



* $P < 0.05$ vs. miR-NC group.

图4 circRNA TCF25与miR-128b结合位点及各细胞相对荧光强度
Fig.4 CircRNA TCF25 and miR-128b binding sites and relative fluorescence intensity in cells

miR-NC组细胞,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);在转染MUT circRNA TCF25细胞中,miR-128b mimic组和miR-NC组细胞相对荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图4。

3 讨论

目前乳腺癌的发病机制尚不清楚。普遍认为乳腺癌的发生是体内外多种因素(包括遗传、高龄、肥胖、高脂肪饮食、月经初潮早、首次妊娠晚、抽烟酗酒等)共同作用的结果^[7]。临床上治疗乳腺癌以手术治疗为主,辅以放化疗、内分泌治疗等综合治疗策略,但患者存在不良反应多、复发转移率高等问题。近年来,分子靶向药物的出现为乳腺癌的临床治疗提供了新思路,因此探究乳腺癌新的分子靶点对乳腺癌治疗意义重大。

circRNA是近年来发现的,它广泛存在于真核细胞内,结构较为稳定,基因序列高度保守^[8]。众多研究^[9-11]发现,circRNA可通过竞争性结合miRNA来解除miRNA对靶基因表达的抑制作用,在人类多种疾病的发生发展过程中发挥作用。王敏等^[12]研究显示,circRNA TCF25可通过靶向抑制miR-103a-3p/miR-107表达,促进细胞分裂蛋白激酶6(CDK6)的表达,进而在膀胱癌的增殖和迁移中发挥促进作用。Li等^[13]发现,过表达circRNA TCF25可通过降低miR-206的水平促进骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。本研究结果显示,与未经RNase R酶处理的对照组相比,circRNA TCF25的相对表达量在RNase R酶处理后无明显变化,而线性TCF25的相对表达量在经RNase R酶处理后降低,且circRNA TCF25在胞质

中的相对表达量高于细胞核,验证了circRNA TCF25的环状特性,且证实了其位于胞质。miR-128被认为是一种具有抑癌和促癌双面功能的miRNA,通常情况下发挥抑癌基因的作用,同时具有调节细胞增殖、凋亡和耐药等作用^[14]。LIU等^[15]指出,长链非编码RNA浆细胞瘤变异易位1(PVT1)可通过靶向抑制miR-128的表达诱导乳腺癌细胞的上皮-间质转化、增殖和转移,参与乳腺癌的进展。本研究中,与空白组和si-NC组比较,si-circRNA TCF25组细胞增殖活力降低,凋亡率升高;pcDNA-circRNA TCF25组细胞增殖活力升高,凋亡率降低。与空白组和miR-NC组比较,miR-128b mimic组细胞增殖活力降低,凋亡率升高;miR-128b inhibitor组细胞增殖活力升高,凋亡率降低。与pcDNA-circRNA TCF25组比较,pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞增殖活力降低,凋亡率升高,提示circRNA TCF25可促进人乳腺癌细胞MCF-7增殖,抑制其凋亡;而miR-128b能够抑制人乳腺癌细胞MCF-7增殖,促进其凋亡。而且上调miR-128b表达能够逆转过表达circRNA TCF25对人乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡的影响,与以往研究结果一致。

本研究还发现,与空白组和si-NC组比较,si-circRNA TCF25组细胞Ki-67表达降低,PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达升高;pcDNA-circRNA TCF25组细胞Ki-67表达升高,PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达降低。与空白组和miR-NC组比较,miR-128b mimic组细胞Ki-67表达降低,PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达升高;miR-128b inhibitor组细胞Ki-67表达升高,PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达降低。与pcDNA-circRNA TCF25组比较,pcDNA-circRNA TCF25+miR-128b mimic组细胞Ki-67表达降低,PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达升高,提示circRNA TCF25有促进Ki-67的表达,抑制PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达的作用,而miR-128b的作用与circRNA TCF25相反,且上调miR-128b表达能够逆转过表达circRNA TCF25对人乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡相关基因蛋白表达的影响。PTEN是一种具有特异性磷酸酯酶活性的抑癌基因,具有抑制肿瘤细胞生长增殖、诱导细胞周期阻滞和促进细胞凋亡等多种功能。相关研究^[16]显示,PTEN在多种肿瘤细胞中表达水平降低。caspase-3是细胞凋亡中的最后

执行因子,当细胞受到凋亡信号刺激时caspase-3活化,活化的caspase-3通过酶切割特异性底物、DNA修复相关分子及细胞骨架蛋白等促进细胞凋亡^[17]。Ki-67是一种核蛋白,表达于细胞生长发育的各个周期,能反映组织细胞的增殖活性^[18]。马兆霞^[19]指出,miR-128可通过激活PTEN信号通路参与调控子宫内膜癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等细胞生物学行为;MA等^[20]研究显示,miR-128b可通过促进caspase-3表达促进大脑中动脉闭塞大鼠脑组织细胞凋亡。LIANG等^[21]发现,miR-128可通过下调Ki-67在胃癌细胞中的表达抑制胃癌细胞的生长,提高化疗敏感性。双荧光素酶实验结果证实了circRNA TCF25可靶向调控miR-128b,因此合理推测circRNA TCF25可能是通过靶向抑制miR-128b的表达,调控其下游的细胞增殖、凋亡相关基因表达来发挥促进人乳腺癌细胞MCF-7增殖,抑制其凋亡作用的。

综上所述,circRNA TCF25可能是通过靶向抑制miR-128b表达,促进Ki-67表达,抑制PTEN、caspase-3、活化的caspase-3表达,发挥促进人乳腺癌细胞MCF-7增殖,抑制其凋亡作用的。本研究初步阐释了circRNA TCF25对人乳腺癌细胞MCF-7增殖、凋亡的影响及可能作用机制,为乳腺癌的临床治疗提供了潜在靶点。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA A Cancer J Clinicians, 2021, 71 (3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] KRISTENSEN LS, JAKOBSEN T, HAGER H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19 (3): 188-206. DOI: 10.1038/s41571-021-00585-y.
- [3] ZHANG W, LIU H, JIANG JJ, et al. CircRNA circFOXK2 facilitates oncogenesis in breast cancer via IGF2BP3/miR-370 axis [J]. Aging, 2021, 13 (14): 18978-18992. DOI: 10.18632/aging.203347.
- [4] YIN H, WANG HY, WANG ML, et al. CircTCF25 serves as a sponge for miR-206 to support proliferation, migration, and invasion of glioma via the Jak2/p-Stat3/CypB axis [J]. Mol Carcinog, 2022, 61 (6): 558-571. DOI: 10.1002/mc.23402.
- [5] 陈旭轮, 王帅, 宋明欣, 等. 过表达环状RNA circTCF25经miR-128靶向VEGF-C对膀胱癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2022, 26 (1): 77-80.
- [6] 翁沛华. 超声-微泡介导miR-128通过调节PTEN抑制乳腺癌细胞阿霉素耐药 [J]. 广州医药, 2021, 52 (6): 35-38. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8535.2021.06.007.
- [7] HOUGHTON SC, HANKINSON SE. Cancer progress and priorities: breast cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2021, 30 (5): 822-844. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-20-1193.

- [8] MISIR S, WU N, YANG BB. Specific expression and functions of circular RNAs [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (3) : 481-491. DOI: 10.1038/s41418-022-00948-7.
- [9] TONG KL, TAN KE, LIM YY, et al. CircRNA-miRNA interactions in atherogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477 (12) : 2703-2733. DOI: 10.1007/s11010-022-04455-8.
- [10] HUANG W, WU YY, QIAO MX, et al. CircRNA-miRNA networks in regulating bone disease [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237 (2) : 1225-1244. DOI: 10.1002/jcp.30625.
- [11] ZHAO X, ZHONG YX, WANG XD, et al. Advances in circular RNA and its applications [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19 (6) : 975-985. DOI: 10.7150/ijms.71840.
- [12] 王敏, 杨睿, 钟镇宇, 等. 环状RNA circTCF25通过miR-103a-3p/miR-107调控CDK6的表达促进膀胱癌的增殖和迁移 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40 (6) : 929-936. DOI: 10.11844/cjcb.2018.06.0354.
- [13] LI Z, LI XY, XU DR, et al. An update on the roles of circular RNAs in osteosarcoma [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54 (1) : e12936. DOI: 10.1111/cpr.12936.
- [14] GAO PF, WANG HZ, LIU J, et al. MiR-128 regulated the proliferation and autophagy in porcine adipose-derived stem cells through targeting the JNK signaling pathway [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41 (2) : 196-201. DOI: 10.1080/10799893.2020.1805627.
- [15] LIU SY, CHEN WQ, HU H, et al. Long noncoding RNA PVT1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by binding miR-128-3p and UPF1 [J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23 (1) : 115. DOI: 10.1186/s13058-021-01491-y.
- [16] XIE P, PENG ZQ, CHEN YJ, et al. Neddylation of PTEN regulates its nuclear import and promotes tumor development [J]. *Cell Res*, 2021, 31 (3) : 291-311. DOI: 10.1038/s41422-020-00443-z.
- [17] ASADI M, TAGHIZADEH S, KAVIANI E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects [J]. *Biotech And App Biochem*, 2022, 69 (4) : 1633-1645. DOI: 10.1002/bab.2233.
- [18] UXA S, CASTILLO-BINDER P, KOHLER R, et al. Ki-67 gene expression [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28 (12) : 3357-3370. DOI: 10.1038/s41418-021-00823-x.
- [19] 马兆霞. MiR-128通过PTEN/PI3K/Akt通路调控DJ-1表达对Ishikawa子宫内膜癌细胞生物学功能的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [20] MA J, BAO L, XIA X, ET AL. MiR-128b promotes cerebral infarction by regulating the expressions of BCL-2 and CAPASE 3 [J]. *World Neurosurg*, 2019, 123 : e245-e251. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.11.144.
- [21] LIANG LQ, KANG HC, JIA JM. HCP5 contributes to cisplatin resistance in gastric cancer through miR-128/HMGA2 axis [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20 (11) : 1080-1090. DOI: 10.1080/15384101.2021.1924948.

(编辑 武玉欣)

(上接第197页)

- [9] QURESHI AI, LUFT AR, SHARMA M, et al. Frequency and determinants of postprocedural hemodynamic instability after carotid angioplasty and stenting [J]. *Stroke*, 1999, 30 (10) : 2086-2093. DOI: 10.1161/01.str.30.10.2086.
- [10] GALYFOS GC, TSOUTSAS I, KONSTANTOPOULOS T, et al. Editor's choice - early and late outcomes after transcatheter revascularisation for internal carotid artery Stenosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Vasc Endovascular Surg*, 2021, 61 (5) : 725-738. DOI: 10.1016/j.ejvs.2021.01.039.
- [11] TUROWICZ A, CZAPIGA A, MALINOWSKI M, et al. Carotid revascularization improves cognition in patients with asymptomatic carotid artery Stenosis and cognitive decline. Greater improvement in younger patients with more disordered neuropsychological performance [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2021, 30 (4) : 105608. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105608.
- [12] TSUJIKAWA S, IKESHITA K. Low-dose dexmedetomidine provides hemodynamics stabilization during emergence and recovery from general anesthesia in patients undergoing carotid endarterectomy: a randomized double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Anesth*, 2019, 33 (2) : 266-272. DOI: 10.1007/s00540-019-02612-w.
- [13] SU X, MENG ZT, WU XH, et al. Dexmedetomidine for prevention of delirium in elderly patients after non-cardiac surgery: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10054) : 1893-1902. DOI: 10.1016/S0140-6736 (16) 30580-3.
- [14] LIN TF, YEY YC, LIN FS, et al. Effect of combining dexmedetomidine and morphine for intravenous patient-controlled analgesia [J]. *Br J Anaesth*, 2009, 102 (1) : 117-122. DOI: 10.1093/bja/aen320.
- [15] YANG JJ, FENG H, LI J, et al. Cerebral protection of intraoperative infusion of dexmedetomidine in patients with chronic cerebrovascular Stenosis undergoing endovascular interventional therapies: a prospective randomized controlled trial [J]. *Ann Vasc Surg*, 2023, 89 : 182-189. DOI: 10.1016/j.avsg.2022.09.050.
- [16] CHENG JX, ZHU PF, QIN H, et al. Dexmedetomidine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in neonatal rats by inhibiting TLR4 signaling [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46 (7) : 2925-2932. DOI: 10.1177/0300060518781382.
- [17] ELGEBALY AS, SABRY M. Sedation effects by dexmedetomidine versus propofol in decreasing duration of mechanical ventilation after open heart surgery [J]. *Ann Card Anaesth*, 2018, 21 (3) : 235-242. DOI: 10.4103/aca.ACA_168_17.
- [18] ZHU LJ, ZHANG Y, ZHANG ZF, et al. Activation of PI3K/Akt/HIF-1 α signaling is involved in lung protection of dexmedetomidine in patients undergoing video-assisted thoracoscopic surgery: a pilot study [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14 : 5155-5166. DOI: 10.2147/DDDT.S276005.

(编辑 于溪)