

*circ-CCDC66*促进MCF-7细胞增殖、迁移、侵袭及干细胞样表型形成

曾伟华^{1,2}, 黎颂铭³, 郭锦全³, 郭志云⁴, 唐杰东³,
邹国荣^{1,2}, 苏珍^{1,2}, 殷琛^{1,2}, 何艳^{1,2}, 李微绽^{1,2}

(1. 广州医科大学附属番禺中心医院肿瘤科; 2. 广州医科大学附属番禺中心医院番禺区肿瘤研究所;
3. 广州医科大学附属番禺中心医院乳腺甲状腺外科; 4. 广州医科大学附属番禺中心医院病理科, 广东 广州 511400)

摘要:目的:明确环状RNA *circ-CCDC66*在乳腺癌中的表达特征与生物学功能,并初步探讨其潜在的调控靶基因。方法:选取正常乳腺上皮细胞MCF-10A及4株乳腺癌细胞株(MCF-7、MDA231、MDA453、MDA-MB-468),通过qPCR检测*circ-CCDC66*在细胞株中的表达,并结合琼脂糖凝胶电泳及Sanger测序确认其环化结构。利用Lipofectamine 2000将*circ-CCDC66*过表达质粒或*circ-CCDC66* siRNAs转染至MCF-7细胞,构建对照组与实验组,分别开展CCK-8细胞活力检测、Transwell迁移与侵袭实验以及干细胞成球实验评估表型变化。同时,在临床组织样本(包括癌组织和癌旁组织)中,使用qPCR技术检测*circ-CCDC66*的表达情况。RNA测序筛选差异表达mRNA,富集通路分析识别关键代谢信号通路,选取其中代表性基因*BPNT1*与*KYATI*进行qPCR验证。**结果:***circ-CCDC66*在乳腺癌细胞中显著高表达,且可稳定存在。其过表达促进MCF-7细胞的增殖、迁移、侵袭及干细胞样表型形成($P < 0.05$)。此外,siRNA敲低实验进一步验证了*circ-CCDC66*在乳腺癌细胞中的功能作用。对PCDH-NC与PCDH-*circ-CCDC66*组细胞的转录组分析识别出61个差异表达基因(34个上调,27个下调),主要富集于硫代谢、含硒化合物代谢和氨基酸代谢等信号通路。qPCR结果显示*BPNT1*与*KYATI*在*circ-CCDC66*过表达组中表达均显著下调,qPCR验证结果与RNA测序一致。**结论:***circ-CCDC66*可促进MCF-7细胞的增殖、迁移、侵袭及干细胞样表型形成,下调*BPNT1*和*KYATI*表达。

关键词:乳腺癌; *circ-CCDC66*; 增殖; 迁移; 干细胞

中图分类号:R730.231 文献标志码:A 文章编号:2097-7174(2025)12-1138-08

DOI:10.3969/j.issn.2097-7174.2025.12.003

circ-CCDC66 in promoting proliferation, migration, invasion and stem-like phenotype in MCF-7 cells

ZENG Wei-hua^{1,2}, LI Song-ming³, GUO Jin-quan³, GUO Zhi-yun⁴, TANG Jie-dong³,
ZOU Guo-rong^{1,2}, SU Zhen^{1,2}, YIN Chen^{1,2}, HE Yan^{1,2}, LI Wei-zhan^{1,2}

(1. Department of Oncology, The Affiliated Panyu Central Hospital, Guangzhou Medical University; 2. Cancer Institute of Panyu District, The Affiliated Panyu Central Hospital, Guangzhou Medical University; 3. Department of Breast and Thyroid Surgery, The Affiliated Panyu Central Hospital, Guangzhou Medical University; 4. Department of Pathology, The Affiliated Panyu Central Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511400)

Abstract: Objective: To clarify the expression pattern and biological role of circular RNA *circ-CCDC66* in breast cancer, and to preliminarily explore its potential downstream target genes. **Methods:** Normal breast epithelial cells (MCF-10A) and four breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MDA-MB-468) were selected. The expression of *circ-CCDC66* was examined by quantitative PCR (qPCR), and its circular structure was validated using

基金项目:广州市科技计划项目(202201010779)

作者简介:曾伟华,男,硕士,副主任医师,研究方向:乳腺癌、泌尿生殖系统肿瘤及头颈部肿瘤。E-mail:zsdennis@163.com

通信作者:李微绽,女,硕士,主任医师,研究方向:肺癌、消化道肿瘤及乳腺癌。E-mail:drliweizhan@126.com

agarose gel electrophoresis and Sanger sequencing. The *circ-CCDC66* overexpression plasmid or *circ-CCDC66* siRNAs were transfected into MCF-7 cells by Lipofectamine 2000 to construct the control group and the experimental group. CCK-8 assays were performed to assess cell viability, Transwell assays were used to evaluate migratory and invasive abilities, and mammosphere formation assays were conducted to examine stem cell-like phenotypes. The expression of *circ-CCDC66* was confirmed using qPCR in clinical tissue samples (including cancer tissues and adjacent tissues). RNA sequencing was used to identify differentially expressed mRNAs, and enrichment pathway analysis was employed to identify key metabolic signaling events. Two representative genes, *BPNT1* and *KYAT1*, were selected for further qPCR validation.

Results: *circ-CCDC66* was found to be upregulated in breast cancer cells and exhibited a stable circular configuration. Its overexpression enhanced the proliferation, migration, invasion, and stem-like properties of MCF-7 cells ($P < 0.05$). Besides, siRNA interference experiments further verified the functional role of *circ-CCDC66* in breast cancer cells. Transcriptome analysis of cells in the PCDH-NC and PCDH-*circ-CCDC66* groups revealed 61 differentially expressed genes, including 34 upregulated and 27 downregulated, which were predominantly enriched in sulfur metabolism, selenocompound metabolism, and cyanoamino acid metabolism pathways. qPCR validation demonstrated that *BPNT1* and *KYAT1* were downregulated in the *circ-CCDC66* overexpression group, consistent with the RNA-seq results. **Conclusion:** *circ-CCDC66* enhances proliferation, migration, invasion, and mammosphere formation in MCF-7 cells, and downregulates the expression of *BPNT1* and *KYAT1*.

Key words: Breast cancer; *circ-CCDC66*; Proliferation; Migration; Stem cell

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率持续上升,给人民健康带来巨大负担。乳腺癌的发生发展通常伴随着乳腺上皮细胞快速增殖、迁移和侵袭的生物学特征^[1]。环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 是一类由线性 RNA 经反向剪接形成的共价闭环结构的非编码 RNA,在多种肿瘤中具有重要的调控作用^[2]。研究发现 *circ_104824*^[3]、*circ_0008673*^[4]、*circBCBM1*^[5] 等 circRNAs 在多种癌症中具有重要调控作用, circRNAs 被认为可能成为癌症治疗的新兴靶点。研究发现,多种 circRNAs 在乳腺癌组织中表达上调,并通过调控下游靶基因参与肿瘤细胞的生物学过程。例如,上调的 *circRNA_0000515* 可与 miR-1296-5p 结合来增加 CDK2 表达水平,促进乳腺癌细胞的增殖和迁移^[6];上调的 *circ-NEIL3* 亦可通过靶向 miR-4784 促进肿瘤的发生发展^[7]。*circ-CCDC66* 来源于母基因 *CCDC66*, 其在肝癌^[7]、宫颈癌^[8]、胃癌^[9]、甲状腺乳头状癌^[10] 均呈高表达,但也有研究^[11] 表明其在结直肠癌患者血浆中表达降低。目前关于 *circ-CCDC66* 在乳腺癌中的表达及功能尚不清楚,且其下游的调控机制也不清楚。因此,本文拟研究 *circ-CCDC66* 在乳腺癌细胞中的表达情况及其调控肿瘤细胞的功能,寻找其下游可能的靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 正常乳腺上皮细胞 MCF-10A

及乳腺癌细胞系 (MCF-7、MDA231、MDA453 和 MDA-MB-468) 均购自广州赛库生物有限公司;高糖 DMEM 培养基、MEM 培养基、L-15 培养基以及 FBS 均购自 Gibco 公司 (美国);RNA 提取试剂 (TriQuick Reagent) 与琼脂糖均购自北京索莱宝科技有限公司;逆转录试剂 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 与荧光定量 PCR 试剂 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 均购自诺唯赞生物技术股份有限公司;定量 PCR 所用引物由英潍捷基生物科技有限公司合成并同时完成 Sanger 测序;重组质粒 (PCDH-NC 及 PCDH-*circ-CCDC66*) 由安徽通用生物技术有限公司合成;转染试剂 Lipofectamine™ 2000 和 Opti-MEM 培养基购自 Thermo Fisher Scientific (美国);CCK-8 试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司;Transwell 小室 (孔径 8 μm) 购自 Corning 公司 (美国);Matrigel 基质胶购自 BD 公司 (美国);PBS 缓冲液、B27 添加剂、EGF 及 FGF 生长因子均购自广州沃巨生物科技有限公司。

1.1.2 临床样本 2024 年 3 月到 2024 年 6 月在广州医科大学附属番禺中心医院肿瘤科收集 20 例乳腺癌患者的癌组织与癌旁组织。手术过程中,外科医师将标本切除后立即放入液氮冻存。本研究经我院医学伦理委员会批准 (批准号:PYRC-2024-263-01),并获得患者同意签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-10A 于高糖 DMEM 培养基中培养,培养基中补充 10% FBS。乳腺癌细胞系

MCF-7于MEM培养基中培养,MDA-MB-231、MDA-MB-453与MDA-MB-468于L-15培养基中培养,以上培养基均加入10% FBS。所有细胞均置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中培养,并根据细胞状态定期传代。

1.2.2 转染 将MCF-7细胞分为空载质粒对照组(PCDH-NC)与*circ-CCDC66*过表达组(PCDH-*circ-CCDC66*)。按照Lipofectamine™ 2000试剂盒说明,将1 μg质粒DNA与2 μL转染试剂分别用Opti-MEM培养基稀释至100 μL,静置5 min后混合,在室温下再次孵育5 min以形成DNA-脂质体复合物。随后将转染混合液逐滴加入细胞培养孔中,轻轻摇匀后置于37℃、5% CO₂恒温培养箱孵育24 h。转染24 h后收集细胞,用于后续实验。同样采用Lipofectamine™ 2000试剂和3种不同的siRNAs(1、2和3)进行转染以构建*circ-CCDC66*敲低的细胞模型。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳与Sanger测序 从已完成转染的MCF-7细胞中分别提取总RNA和基因组DNA(gDNA)。总RNA经逆转录获得cDNA,2类模

板(cDNA与gDNA)均采用*circ-CCDC66*、*CCDC66*和*GAPDH*引物进行扩增反应。PCR体系总体积设为25 μL(2×预混液12.5 μL,引物各1 μL,模板1 μL,无RNA酶水补足至终体积)。热循环程序为:95℃预变性3 min,之后35个循环(95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s),终末延伸72℃ 5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶分离,恒压120 V条件下电泳约30 min,随后成像。将*circ-CCDC66*所对应的特异性扩增条带经回收后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成Sanger测序。

1.2.4 qPCR 使用TriQuick Reagent提取PCDH-NC、PCDH-*circ-CCDC66*细胞总RNA,并按照HiScript III RT SuperMix for qPCR试剂盒说明进行反转录生成cDNA。qPCR反应体系总体积为20 μL,包括10 μL SYBR Premix、0.4 μL上游引物、0.4 μL下游引物(终浓度均为0.2 μmol·L⁻¹)、1 μL cDNA模板和8.2 μL无RNA酶水。扩增程序为95℃预变性30 s,随后40个循环(95℃ 10 s,60℃ 30 s)。采用*GAPDH*作为内参基因,通过2^{-ΔΔCt}法计算目的基因mRNA相对表达量。引物序列参见表1。

表1 引物序列

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
<i>GAPDH</i>	GTGGGTCTCGCTGTGGAAG	GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC
<i>circ-CCDC66</i>	GGATGTGTTATGGCAAACAGT	TCCAGCAGTACTGTTTCCTGAT
<i>BPNT1</i>	GTGGGAGGCAAGTTAACCGA	TTCTGGAACTCGGCTTGCAT
<i>KYAT1</i>	CAGTGGATGGTCTACGACGG	CGCAGGTGTCTCATGATGTG
<i>CCDC66</i>	AGGAACATGACAGATGGGCA	ATCAGCCAGCTCCTGAGTGT

1.2.5 CCK-8实验 转染24 h的MCF-7细胞经胰酶消化后,以每孔3×10³个细胞的密度接种于96孔板中,每组设3个复孔。分别在细胞培养12、24、48和72 h后,向对应孔中加入10 μL CCK-8试剂,继续在37℃、5% CO₂恒温培养箱中孵育2 h。孵育结束后,使用酶标仪在450 nm波长下读取各孔的吸光度值。

1.2.6 Transwell实验 转染24 h后的MCF-7细胞经胰酶消化后,用无血清培养基重悬并计数,用于Transwell实验。(1)迁移实验:取1×10⁵个细胞,悬于100 μL无血清培养基中,加入至上室;下室则加入600 μL含10%FBS培养基作为吸引源。细胞在37℃、5% CO₂恒温培养箱中孵育48 h。孵育结束后移出Transwell小室,弃去上室培养基,使用无钙PBS轻柔冲洗2次。随后在室温下用4%多聚甲醛固定2 h,再以0.1%结晶紫溶液染色20 min。染色后,使用棉签小心擦除未穿膜的细胞,并用PBS清洗3次。

最终在光学显微镜下观察并记录穿膜细胞的分布与数量;(2)侵袭实验:上室需提前均匀涂覆Matrigel基质胶,并在37℃下使其充分凝固。其他操作同迁移实验。

1.2.7 干细胞成球实验 转染24 h后的MCF-7细胞用0.5%胰蛋白酶处理以解离细胞。消化结束后立即终止反应并离心收集细胞沉淀,随后使用无血清干细胞成球培养基重悬,培养基由DMEM/F12、2% B27添加剂、20 ng·mL⁻¹表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)及20 ng·mL⁻¹成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)组成。按每孔1×10⁵个细胞接种于低附着性的6孔培养板中,于37℃、5% CO₂培养箱中悬浮培养。分别在第3、7、14 d采集图像,记录细胞球的形成与生长情况。

1.2.8 RNA测序及生物信息学分析 MCF-7细胞转染PCDH-*circ-CCDC66*质粒或PCDH-NC质粒24 h

后,收集 PCDH-NC 与 PCDH-*circ-CCDC66* 组细胞,交由北京诺禾致源科技有限公司进行建库和 RNA 测序。测序使用的是 Illumina NovaSeq 6000 平台,测序模式为双端 150 bp(PE150)。原始测序数据经 FastQC 软件进行质量评估与过滤后,使用 HISAT2 完成序列比对,采用 featureCounts 计算每个基因的 reads 计数,用于后续差异表达分析。差异表达 mRNA 的筛选通过 DESeq2 分析,阈值设为变化倍数 ≥ 1.5 且校正后 $P < 0.05$ 。差异表达基因的通路富集分析依托于 KOBAS 3.0 平台,使用 KEGG 数据库作为参考背景,采用超几何分布检验计算各通路的富集显著性。筛选标准为 $P < 0.05$,筛出在统计上显著富集的生物学过程通路。

1.3 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差表示,并通过 GraphPad Prism 8.0 进行图表绘制。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。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

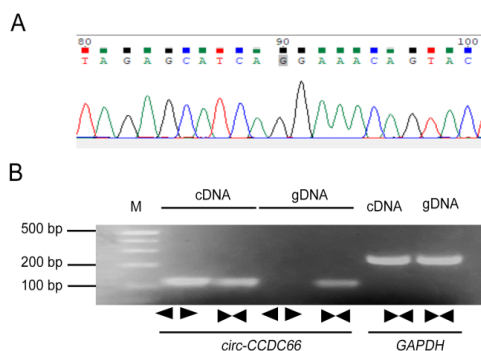
2 结果

2.1 *circ-CCDC66* 的环性验证 通过 Sanger 测序验证 *circ-CCDC66* 是否存在环化位点。其测序结果与 circBase 数据库中记录的环化序列完全一致(图 1A)。随后,分别以 cDNA 与 gDNA 为模板扩增 *circ-CCDC66* 和线性 CCDC66 的特异性片段,并进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果发现, *circ-CCDC66* 仅在 cDNA 样本中扩增出预期条带,而在 gDNA 中未检测到(图 1B)。

2.2 *circ-CCDC66* 在乳腺癌细胞中的表达 为明确 *circ-CCDC66* 在乳腺癌中的表达情况,选取正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及 4 株乳腺癌细胞系(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468),采用 qPCR 技术检测 *circ-CCDC66* 的表达水平。结果如图 2A 所示,相较于 MCF-10A 细胞,乳腺癌细胞中 *circ-CCDC66* 表达水平均显著增加($P < 0.01$)。其中, *circ-CCDC66* 在 MCF-7 细胞中表达水平最低,在 MDA-MB-231 细胞中表达水平最高。后续功能实验以 MCF-7 细胞为模型进行研究。另外 qPCR 结果发现, *circ-CCDC66* 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P < 0.0001$)(图 2B),提示 *circ-CCDC66* 在乳腺癌中高表达。

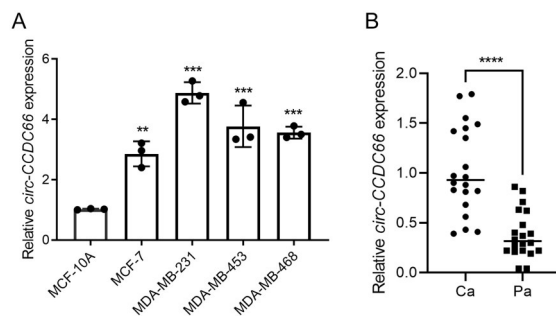
2.3 过表达 *circ-CCDC66* 的细胞模型验证 为明确 *circ-CCDC66* 过表达在乳腺癌细胞中的功能作用,构建 *circ-CCDC66* 过表达细胞模型。qPCR 结果

显示, *circ-CCDC66* 在 PCDH-*circ-CCDC66* 组细胞中的表达量较 PCDH-NC 组显著升高($P < 0.001$)(图 3),表明在 MCF-7 细胞中成功过表达 *circ-CCDC66*。



A: Sanger 测序验证 *circ-CCDC66* 的环化位点; B: 琼脂糖凝胶电泳结果。

图 1 *circ-CCDC66* 的环性验证



A: qPCR 检测 *circ-CCDC66* 在正常乳腺细胞及乳腺癌细胞中表达水平。与 MCF-10A 细胞比较, $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ 。B: qPCR 检测 *circ-CCDC66* 在乳腺癌和癌旁组织中表达。Ca: 乳腺癌组织; Pa: 癌旁组织; $****P < 0.0001$ 。

图 2 *circ-CCDC66* 在乳腺癌中的表达情况

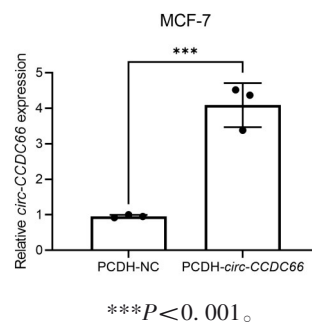


图 3 过表达 *circ-CCDC66* 细胞模型验证

2.4 *circ-CCDC66* 促进 MCF-7 细胞的增殖与迁移能力 CCK-8 实验结果发现,与 PCDH-NC 组比较, PCDH-*circ-CCDC66* 组细胞在 12、24、48、72 h 均呈现更高的细胞活性,且在 72 h 时 2 组细胞活性比较

差异有统计学意义($P < 0.05$)(图4A)。Transwell 迁移实验结果发现,与PCDH-NC组比较,PCDH-*circ-CCDC66*组迁移细胞数量显著增多($P < 0.001$)(图4B)。Transwell 侵袭实验结果发现,与PCDH-NC组比较,PCDH-*circ-CCDC66*组穿膜细胞数显著增多

($P < 0.001$)(图4C)。干细胞成球实验结果得出,与PCDH-NC组比较,PCDH-*circ-CCDC66*组在第3、7、14 d均形成更多、更大的细胞球体(图4D),提示*circ-CCDC66*可能参与维持乳腺癌细胞的干性及自我更新能力。

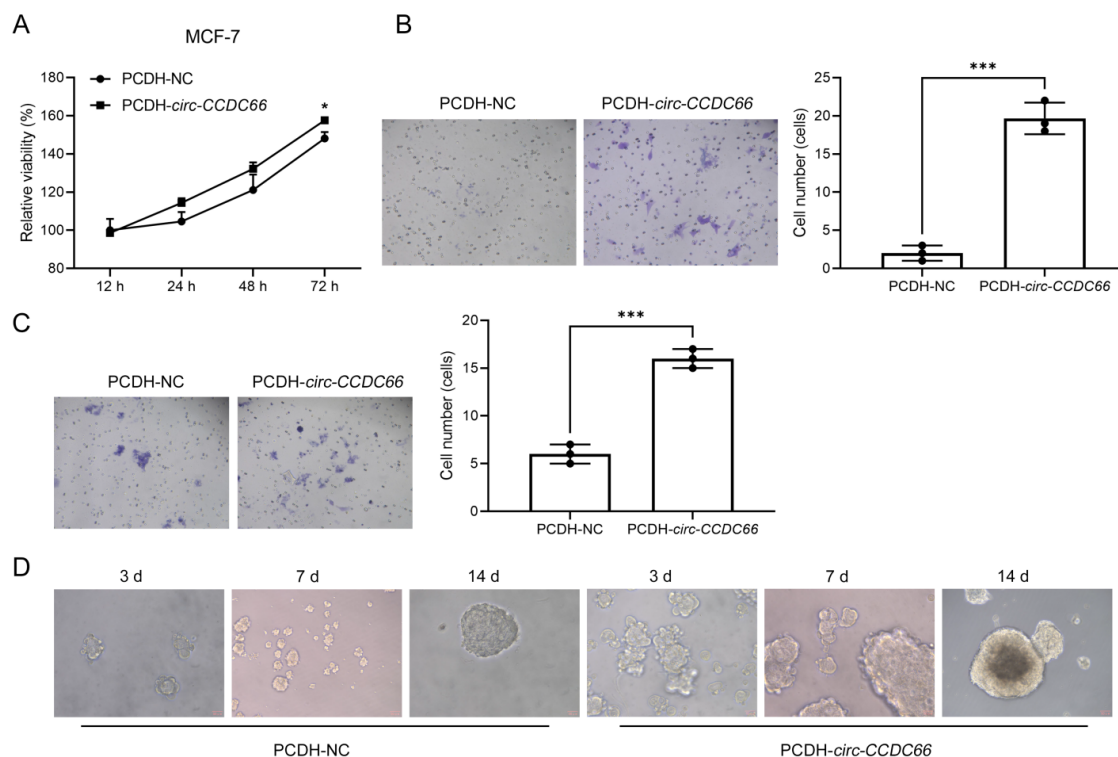
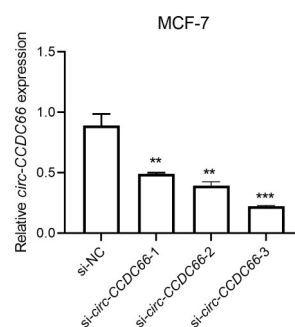


图4 *circ-CCDC66*在MCF-7细胞中过表达后的表型变化
A: CCK-8法检测2组细胞不同时间点的活性;B: Transwell 迁移实验检测2组细胞迁移能力(200×);C: Transwell 侵袭实验检测2组细胞侵袭能力(200×);D: 干细胞成球实验检测2组细胞在低黏附培养条件下成球数量及球体大小(200×)。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

图4 *circ-CCDC66*在MCF-7细胞中过表达后的表型变化

2.5 *circ-CCDC66* 敲低的细胞模型验证 为进一步验证*circ-CCDC66*敲低在乳腺癌细胞中的功能作用,用siRNAs(1、2和3)构建*circ-CCDC66*敲低细胞模型。qPCR结果显示,*circ-CCDC66*在敲低模型细胞中的表达量较si-NC组显著降低,尤其是si-*circ-CCDC66-3*组($P < 0.01$)(图5)。因此,后续实验采用si-*circ-CCDC66-3*组细胞做功能实验。

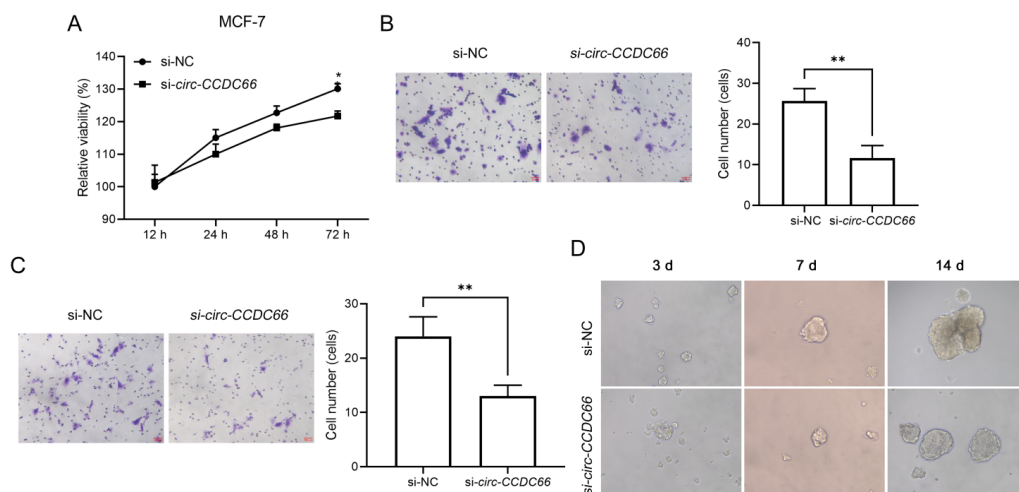
2.6 *circ-CCDC66* 敲低阻止MCF-7细胞的增殖、迁移和干性能力 CCK-8结果发现,相比于si-NC组,si-*circ-CCDC66*组呈现更低的细胞活性($P < 0.05$)(图6A),提示*circ-CCDC66*沉默抑制细胞增殖。Transwell 迁移实验结果显示,*circ-CCDC66*敲低组相比于si-NC组的迁移细胞数量明显减少($P < 0.01$)(图6B)。侵袭实验结果显示,si-*circ-CCDC66*组穿膜细胞数也显著低于si-NC组($P < 0.01$)(图6C)。



与si-NC组比较,** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ 。

图5 *circ-CCDC66*敲低细胞模型验证

干细胞成球实验结果也表明,与si-NC组相比,*circ-CCDC66*敲低组在第3、7、14 d均形成更少、更小的细胞球体,提示*circ-CCDC66*沉默可能抑制乳腺癌细胞的干性及自我更新能力(图6D)。



A: CCK-8法检测2组细胞在不同时间点(12、24、48、72 h)的活力变化;B: Transwell 迁移实验结果(200×);C: Transwell 侵袭实验结果(200×);D: 干细胞成球实验结果(200×)。与si-NC组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

图6 *circ-CCDC66*在MCF-7细胞中敲低后的表型变化

2.7 转录组测序分析 PCDH-NC及PCDH-*circ-CCDC66*组MCF-7细胞经转录组测序,各样本基因数量分布均一,说明测序数据质量良好(图7A)。各样本之间的相关性分析显示相似性均高于94%,具备良好的可比性(图7B)。根据筛选标准(Fold change ≥ 1.5 且 $\text{padj} < 0.05$),共筛选出61个差异表达基因,其中上调基因34个,下调基因27个(图7C~7D)。对差异基因进行KEGG富集分析,发现差异基因主要富集于3个代谢相关通路:硫代谢通路(Sulfur metabolism)、含硒化合物代谢通路(Cyanoamino acid metabolism)及氰基氨基酸代谢通路(Cyanoamino acid metabolism)(图7E)。

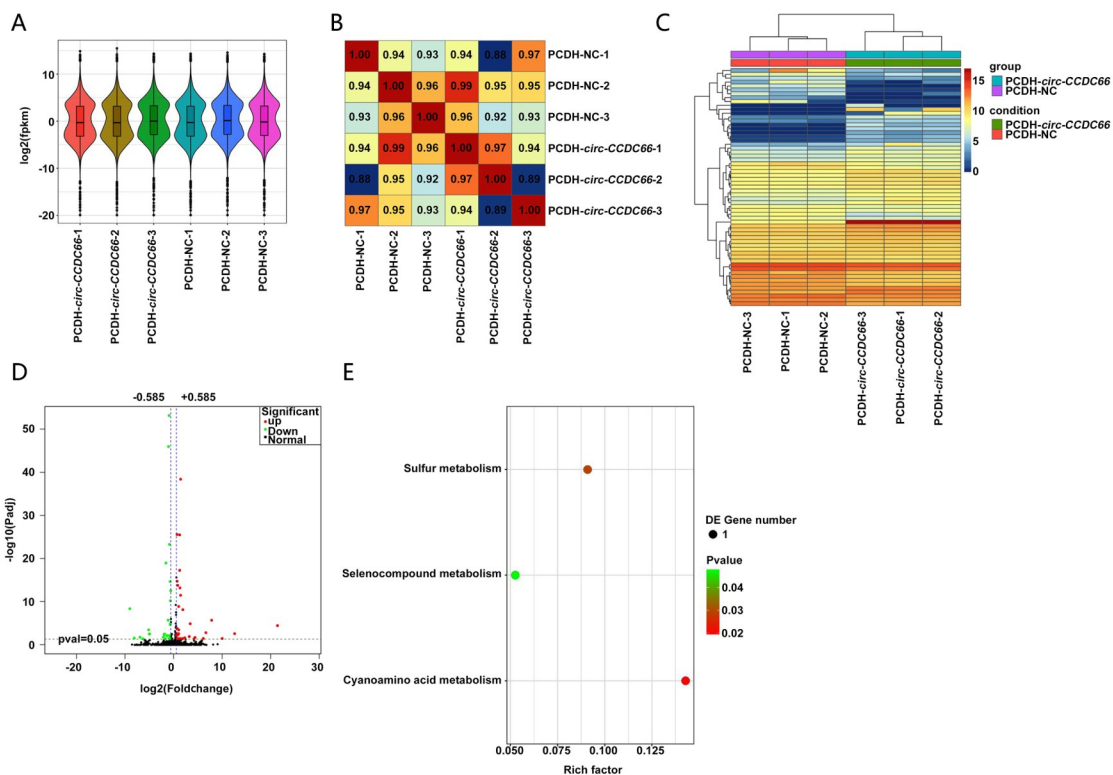
2.8 *circ-CCDC66*过表达对BPNT1、KYAT1及new_gene460基因表达的影响 在硫代谢通路、含硒化合物代谢通路以及氰基氨基酸代谢通路中筛选出3个具有代表性的差异表达基因,分别为BPNT1、KYAT1和新发现的基因new_gene460。与PCDH-NC组相比,PCDH-*circ-CCDC66*组new_gene460表达水平上调,BPNT1和KYAT1基因表达水平下调(图8A)。其中,new_gene460尚缺乏公开数据库的功能注释,生物学作用尚不清楚,故本研究选取BPNT1和KYAT1基因作为验证对象。为进一步验证转录组分析结果的可靠性,我们在相同批次的测序样本中,采用qPCR检测BPNT1和KYAT1基因的表达水平。结果发现,与PCDH-NC组比较,PCDH-*circ-CCDC66*组BPNT1和KYAT1基因表达水平下调(图8B),且与图8A显示的RNA测序数据一致,提示差异分析结果具备良好的稳定性和重复性。

3 讨论

本研究系统分析了*circ-CCDC66*在乳腺癌细胞中的表达水平及其生物学功能。结果显示,*circ-CCDC66*在乳腺癌细胞和组织中表达显著增加,过表达*circ-CCDC66*可增强MCF-7细胞增殖、迁移、侵袭能力及干细胞样特性。同时,转录组测序结果提示,其过表达可引起多种基因mRNA表达水平的显著变化,其中2个代谢相关基因BPNT1和KYAT1在*circ-CCDC66*过表达组中显著下调。

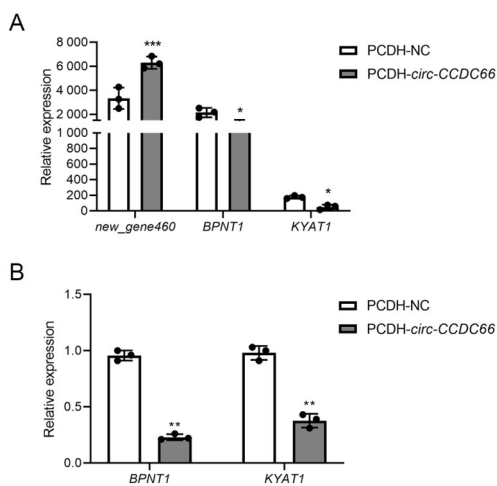
多项研究显示,在*circ-CCDC66*的表达方面,不同研究的结果存在一定差别。在宫颈癌^[8]、胃癌^[9]及甲状腺乳头状癌^[10]中,*circ-CCDC66*表达上调并与肿瘤进展密切相关,而在结直肠癌患者的血浆中则呈低表达,且可作为早期诊断的生物标志物^[11]。也有研究^[12]表明*circ-CCDC66*在M2型巨噬细胞来源的外泌体中被富集,并在肿瘤微环境中通过miR-342-3p/MTDH通路促进结直肠癌细胞的恶性表型。表明circRNAs在不同来源细胞与组织之间可能具有不同功能。本文研究发现,*circ-CCDC66*在乳腺癌患者组织中高表达,在乳腺癌细胞中也高表达,且过表达*circ-CCDC66*可增强乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭及干细胞成球能力,*circ-CCDC66*敲低则抑制乳腺癌细胞的这些功能。然而,是否在乳腺癌中也存在免疫细胞来源*circ-CCDC66*的外泌体调控路径,仍需结合免疫微环境进行探索。

BPNT1是硫代谢通路的一个重要成员,具有小



A:小提琴图显示各测序样本中检测到的基因表达丰度分布;B:相关性分析图显示各样本之间的Pearson相关系数;C:火山图表示差异表达基因整体分布情况;D:热图表示筛选出的差异基因在不同样本间的表达趋势;E:差异表达基因的KEGG通路富集分析。

图7 过表达 *circ-CCDC66* 改变 MCF-7 细胞中一系列基因的表达



A:RNA 测序检测 *BPNT1*、*KYAT1* 及 *new_gene460* 基因表达水平;B:qPCR 检测 RNA 测序同一批次样本中 *BPNT1* 与 *KYAT1* 基因表达水平。与 PCDH-NC 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

图8 *circ-CCDC66* 过表达对 *BPNT1*、*KYAT1* 及 *new_gene460* 基因表达的影响

分子磷酸酶活性的胞质蛋白,且其活性受到二价金属阳离子促进和锂抑制^[13],BPNT1 缺失与缺铁性贫血

血相关^[14],且可能存在与神经胶质瘤代谢失调相关的功能障碍^[15]。而本研究结果发现,*circ-CCDC66* 可能通过抑制 BPNT1 表达,参与调节乳腺癌细胞的增殖进程。但 BPNT1 在乳腺癌中是否被 *circ-CCDC66* 直接影响还有待继续探究。

KYAT1 作为含硒化合物代谢(Selenocompound metabolism)通路的重要酶,具备转氨与 β -消除双重活性,可利用硒-甲基硒代半胱氨酸作为底物生成具有细胞毒性作用的代谢产物,从而诱导肿瘤细胞死亡^[16]。已有研究证实,在肝癌模型中联合补充硒-甲基硒代半胱氨酸可显著增强 KYAT1 的抗癌效应^[17],在多形性胶质母细胞瘤和头颈部鳞状细胞癌化疗过程中,KYAT1 表达亦呈明显上调趋势^[18]。而在本研究中,*circ-CCDC66* 过表达显著抑制 KYAT1 表达,提示该环状 RNA 可能通过削弱癌细胞对硒代谢产物的敏感性,降低其对细胞毒信号的响应能力,从而促进乳腺癌细胞的增殖。这一机制是否涉及代谢应激通路的失衡,仍需进一步实验证实。

综上所述,*circ-CCDC66* 在乳腺癌细胞中发挥促进细胞增殖、迁移、侵袭及干性作用,且可下调

BPNT1、*KYAT1* 等代谢相关基因。因此,本研究为 *circ-CCDC66* 参与调控乳腺癌细胞代谢提供了新思路。这是后续进一步探究 *circRNA* 功能和机制及应用于临床研究的前提与基础。本研究也存在一定缺陷:(1)*circ-CCDC66* 抑制 *BPNT1* 和 *KYAT1* 的分子机制有待确定,如通过 *miRNA* 吸附或蛋白质复合物调控;(2)本研究缺乏体内实验验证,在未来研究中可建立异种移植小鼠模型进一步探究 *circ-CCDC66* 对乳腺癌进程的影响。

参考文献:

- [1] 郭睿婧. 中医药治疗乳腺癌患者化疗后恶心呕吐研究进展[J]. 江西中医药, 2012, 43(7): 75-77.
- [2] HUANG X, SONG C, ZHANG J, et al. Circular RNAs in breast cancer diagnosis, treatment and prognosis [J]. *Oncol Res*, 2023, 32(2): 241-249.
- [3] LI X, MA F, WU L, et al. Identification of Hsa_circ_0104824 as a potential biomarkers for breast cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820960745.
- [4] HU Y, SONG Q, ZHAO J, et al. Identification of plasma hsa_circ_0008673 expression as a potential biomarker and tumor regulator of breast cancer [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(9): e23393.
- [5] FU B, LIU W, ZHU C, et al. Circular RNA circBCBM1 promotes breast cancer brain metastasis by modulating miR-125a/BRD4 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(12): 3104-3117.
- [6] 杨琴, 王超, 蒯博涵, 等. *circ_0000515/miR-1296-5p/CDK2* 轴在乳腺癌中的作用 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(4): 317-322.
- [7] 张宝, 王燕, 任维敏. *circNEIL3* 通过靶向 *miR-4784* 调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(8): 707-714.
- [8] ZHANG Y, LI X, ZHANG J, et al. Circ-CCDC66 up-regulates REXO1 expression to aggravate cervical cancer progression via restraining miR-452-5p [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 20.
- [9] YANG M, WANG G Y, QIAN H, et al. Circ-CCDC66 accelerates proliferation and invasion of gastric cancer via binding to miRNA-1238-3p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4164-4172.
- [10] LI P, CHEN J, ZOU J, et al. Circular RNA coiled-coil domain containing 66 regulates malignant development of papillary thyroid carcinoma by upregulating La ribonucleoprotein 1 via the sponge effect on miR-129-5p [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7181-7196.
- [11] LIN J, CAI D, LI W, et al. Plasma circular RNA panel acts as a novel diagnostic biomarker for colorectal cancer [J]. *Clin Biochem*, 2019, 74: 60-68.
- [12] FAN L, XU G, ZENG X. M2 macrophage-derived extracellular vesicles augment immune evasion and development of colorectal cancer via a circRNA_CCDC66/microRNA-342-3p/metadherin axis [J]. *Cytotechnology*, 2023, 75(4): 293-308.
- [13] HUDSON B H, FREDERICK J P, DRAKE L Y, et al. Role for cytoplasmic nucleotide hydrolysis in hepatic function and protein synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(13): 5040-5045.
- [14] HUDSON B H, HALE A T, IRVING R P, et al. Modulation of intestinal sulfur assimilation metabolism regulates iron homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(12): 3000-3005.
- [15] LI W, JIA H, LI Q, et al. Glycerophosphatidylcholine PC(36:1) absence and 3'-phosphoadenylate (pAp) accumulation are hallmarks of the human glioma metabolome [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 14783.
- [16] SELVAM A K, BJÖRNSTEDT M, SELVAM A K, et al. A novel assay method to determine the β -elimination of Se-methylselenocysteine to monomethylselenol by kynurenine aminotransferase 1 [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(2): 139.
- [17] SELVAM A K, JAWAD R, GRAMIGNOLI R, et al. A novel mRNA-mediated and microRNA-guided approach to specifically eradicate drug-resistant hepatocellular carcinoma cell lines by Se-methylselenocysteine [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(7): 1094.
- [18] RIESS C, SCHNEIDER B, KEHNSCHERPER H, et al. Activation of the kynurenine pathway in human malignancies can be suppressed by the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 55.

(收稿: 20225-06-30) (修回: 2025-08-25)

(责任编辑: 刘仰斌)