·论　著·

circRNA_0008720 调控 EMT 促进乳腺癌增殖侵袭的研究

乔恩奇，陈道宝，曹杰，王春雷，王佳

【摘要】目的　探讨 circRNA_0008720 对乳腺癌细胞增殖、侵袭的影响及其可能的作用机制。方法　采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）技术检测乳腺癌组织中 circRNA_0008720、miR-138-5p、SOX4 的表达水平，并通过荧光素酶报告基因实验明确三者之间的靶向关系。通过 CCK-8、Transwell 和 Western blot 检测乳腺癌细胞的上皮细胞-间充质转化（EMT）程度以及增殖、侵袭能力。结果　circRNA_0008720、SOX4 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞系中均表达上调，miR-138-5p 表达降低（均 $P < 0.05$）。敲低 circRNA_0008720 或上调 miR-138-5p 的表达可以抑制乳腺癌细胞的 EMT 进程和增殖、侵袭活性（均 $P < 0.05$），而抑制 miR-138-5p 或过表达 SOX4 能够部分逆转这种作用。结论　circRNA_0008720 可通过海绵化 miR-138-5p 上调 SOX4 表达，促进乳腺癌细胞的 EMT 进程和增殖、侵袭活性。

【关键词】乳腺癌；环状 RNA；微小 RNA；上皮细胞-间充质转化
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.10.003
【中图分类号】R737.9　【文献标志码】A　【文章编号】1671-0800(2024)10-1269-06

circRNA_0008720 regulates epithelial-mesenchymal transition to promote the proliferation and invasion of breast cancer

QIAO Enqi, CHEN Daobao, CAO Jie, WANG Chunlei, WANG Jia (Shaoxing Maternal and Child Health Hospital, Shaoxing 312000, Zhejiang, China)

【Abstract】**Objective**　To investigate the effect of circRNA_0008720 on the proliferation and invasion of breast cancer cells and its possible mechanism. **Methods**　Real-time quantitative fluorescent PCR(qRT-PCR) was used to detect the expression of circRNA_0008720, miR-138-5p and SOX4 in breast cancer tissues, and the targeting relationship between them were determined by luciferase reporter gene assay. The EMT degree, proliferation and invasion ability of breast cancer cells were detected by CCK-8, Transwell and Western blot. **Results**　circRNA_0008720 and SOX4 were up-regulated in breast cancer tissues and breast cancer cell lines, while miR-138-5p expression was decreased. Knockdown the expression of circRNA_0008720 or up-regulate miR-138-5p could inhibit EMT process, proliferation and invasion activity of breast cancer cells; while inhibition of miR-138-5p or overexpression of SOX4 can partially reverse this effect. **Conclusions**　circRNA_0008720 can up-regulate SOX4 expression through sponging miR-138-5p to promote EMT process, proliferation and invasion activity of breast cancer cells.

【Key words】Breast cancer; circRNA; miRNA; Epithelial-mesenchymal transition
[Modern Practical Medicine,2024,3(10):1269-1274]

近年来，乳腺癌的发病率和死亡率呈明显上升趋势，已成为威胁全球女性健康的重要疾病之一[1]。从分子层面探究乳腺癌细胞的增殖、侵袭机制，对于寻找新的治疗靶点、改善预后及降低复发风险具有积极意义。在多种生物学效应中，信使 RNA（mRNA）、微型 RNA（miRNA）和环状 RNA（circRNA）在乳腺癌发生和发展过程中发挥着关键作用，为乳腺癌生物标志物的研究和临床治疗提供了潜在的靶点。circRNAs 能通过一种海绵化调节机制吸附 miRNAs 来调控下游靶基因的表达，从而导致正常组织的结构、功能和代谢发生紊乱[2]。上皮细胞-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）

基金项目：浙江省医药卫生科技计划项目（2021KY547）
作者单位：312000 浙江省绍兴，绍兴市妇幼保健院（乔恩奇、曹杰、王春雷、王佳）；浙江省肿瘤医院（陈道宝）
通信作者：曹杰，Email：caojiemail@foxmail.com

是指上皮细胞失去顶端-基底极性和细胞-细胞黏附，向侵袭性间充质细胞过渡，引起细胞表型改变的一种基因异常表达过程[3-4]。笔者团队前期采用高通量测序技术对乳腺癌患者的癌组织和癌旁组织进行分析，发现了一系列差异表达的circRNAs，对部分上调表达的circRNA进行实时荧光定量PCR（qRT-PCR）验证发现，circRNA_0008720在癌组织中表达显著上调（约上调5.5倍），因此本研究选取circRNA_0008720作为研究对象，来探讨circRNA_0008720对乳腺癌细胞增殖、侵袭的影响及其可能的作用机制，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 组织样本来源 纳入2021年1月至2022年10月在浙江省肿瘤医院和绍兴市妇幼保健院行乳腺癌改良根治手术的乳腺癌患者80例，收集乳腺癌组织及其匹配的癌旁组织。所有患者术前均未接受全身治疗及局部放疗，标本组织均经两位经验丰富的病理医师证实为浸润性乳腺癌。本研究获得绍兴市妇幼保健院医学伦理委员会批准，所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 实验仪器及试剂 人乳腺癌细胞MDA-MB-231购于赛百慷公司，qRT-PCR试剂购于翌圣公司，逆转录试剂盒购于康为世纪公司，TRIzol试剂购自生工生物公司，转染用siRNA、过表达质粒、Lipofectamine 3000试剂均购于吉玛基因公司，Transwell小室购于Corning公司，CCK-8试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒均购于碧云天公司，SOX4 Antibody（ab80261）、E-cadherin Antibody（ab244084）、N-cadherin Antibody（ab256744）及 Snail Antibody（ab82846）均购于Abcam公司。

1.3 细胞培养和转染 人乳腺癌细胞MDA-MB-231在10%胎牛血清+RPMI-1640培养基+青霉素/链霉素双抗培养液、37 ℃、5%CO_2的培养箱中常规培养。当细胞培养达到约70%融合度，按照实验设计分为空白对照组（blank组）、siRNA control组（si-NC组）、hsa_circRNA_0008720 Si RNA组（A组）、hsa_circRNA_0008720 Si RNA+miR-138-5p Si RNA组（B组）、hsa_circRNA_0008720 Si RNA组+SOX4过表达组（C组），转染步骤按照Lipofectamine 3000试剂盒说明书进行操作，培养48 h后收获细胞，通过qPCR技术检测siRNA的敲除效率。

1.4 qRT-PCR 人乳腺癌组织及其匹配的癌旁组织采用Trozel法提取总RNA，按照逆转录试剂盒说明书操作将其合成cDNA后，根据PCR试剂盒说明书进行qPCR实验并测定荧光值，反应条件：95℃，10 min变性；95℃，15 s；60 ℃，60 s；40次循环。采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法计算得到相对表达量。qRT-PCR所用引物序列信息见表1。

1.5 CCK-8法检测细胞增殖 转染后48 h，将细胞以2×10^3个/孔接种于96孔板内，培养48 h后，每孔加入10 μl CCK-8溶液，孵育24 h后用酶标仪测定每个孔在450 nm处的吸光度。

1.6 Transwell法检测细胞侵袭 将Transwell小室放入24孔培养板，上室加入细胞，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h，棉签擦掉基质胶和上室底层细胞，加入0.1%结晶紫染液30 min后拍照，统计侵袭至下室中的细胞数量。

1.7 Western blot检测 用RIPA裂解液将细胞分离并提取蛋白，按照BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶分离等量的蛋白质。将PVDF膜放入孵育盒内，加入含有5%脱脂奶粉的封闭液。将膜置入含一抗稀释液的孵育盒内，经4 ℃摇床振荡过夜，加入5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗，用TBST洗净。加入ELC使蛋白信号可视化，并用chemi capture软件进行分析。

1.8 双荧光素酶报告基因实验 构建circRNA_0008720和SOX4基因的野生型片段cir-

表1 引物序列

基因	上游引物（5’→3’）	下游引物（5’→3’）
circ_0008720	ATGGCAACTGAGATGTGGTGACTG	CAGGCAGCAGAGGTTGACTATGAC
miR-138-5p	TGACCGAGCTGGTGTTGTG	CAGAGCAGGGTCCGAGGTA
SOX4	AGCGACAAGATCCCTTTCATTC	CGTTGCCGGACTTCACCTT
U6	CGCTTCGGCAGCAGATATAC	TTCACGAATTTGCGTGTCATC
GAPDH	GAATGGGCAGCCGTTAGGAA	AAAAGCATCACCCGGAGGAG

cRNA_0008720-WT（circ-WT）和 SOX4-WT，同时设计种子序列的互补序列突变位点 circRNA_0008720-MUT（circ-MUT）和 SOX4-MUT，将基因片段扩增插入到 pmirGLO 载体。将报告质粒与 miR-138-5p NC（miR-NC）、miR-138-5p mimic 转染到 MDA-MB-231 细胞中，48 h 后采集细胞进行充分裂解，离心后取上清液测定萤火虫荧光素酶活性，以肾素荧光素酶活性作为参考依据。

1.9　统计方法　采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析，实验均重复 3 次。计数资料均数±标准差表示，采用 t 检验或单因素方差分析。从癌症基因组图谱（TCGA）数据库收集 EMT 通路中包含的基因集合，使用 ssGSEA 算法依次计算每个样本的富集分数，通过计算基因表达与通路评分的相关性得到 Spearman 相关系数。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　乳腺癌组织中 circRNA_0008720、miR-138-5p、SOX4 的表达　qRT-PCR 结果显示，与癌旁组织相比，乳腺癌组织中 circRNA_0008720、SOX4 的表达均显著升高（均 $P < 0.05$），miR-138-5p 表达降低（$P < 0.05$）。绘制受试者工作特征（ROC）曲线，显示 circRNA_0008720 诊断乳腺的曲线下面积（*AUC*）为 0.986，见图 1。

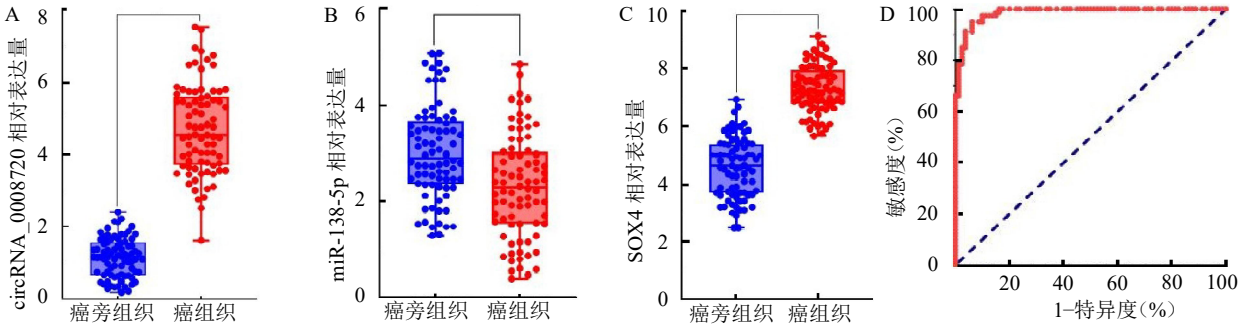
2.2　circRNA_0008720 表达水平对乳腺癌细胞的增殖、侵袭和 EMT 的影响　与 blank 组及 si-NC 组相比，A 组转染 siRNA 后 circRNA_0008720 表达水平显著下降（$P < 0.05$）。与 si-NC 组相比，A 组细胞的增殖、侵袭能力均被显著抑制（均 $P < 0.05$），E-cadherin 蛋白表达水平上调，Snail、N-cadherin 蛋白表达水平下调（均 $P < 0.05$），见图 2。

2.3　circRNA_0008720 的作用机制　为进一步探讨 circRNA_0008720 是否通过海绵化来发挥生物学效应，利用 CircInteractome 数据库发现了 circRNA_0008720 与 miR-138-5p 存在一个互补的结合序列。本文构建了含有 miR-138-5p 结合区域的野生型和突变体位点的荧光素报告载体。检测结果显示，过表达 miR-138-5p 抑制了 circRNA_0008720 野生型荧光素报告载体中的荧光素活力（$P < 0.05$），见图 3。

2.4　miR-138-5p 的下游靶点　为进一步探讨 miR-138-5p 的下游靶点，利用 TargetScan 数据库发现 miR-138-5p 和 SOX4 之间存在可靶向结合的 3’UTR 区，本研究构建了含有 miR-138-5p 结合区域的野生型和突变体位点的荧光素报告载体。检测结果显示，过表达 miR-138-5p 抑制了 SOX4 野生型荧光素报告载体中的荧光素活力（$P < 0.05$），见图 3。

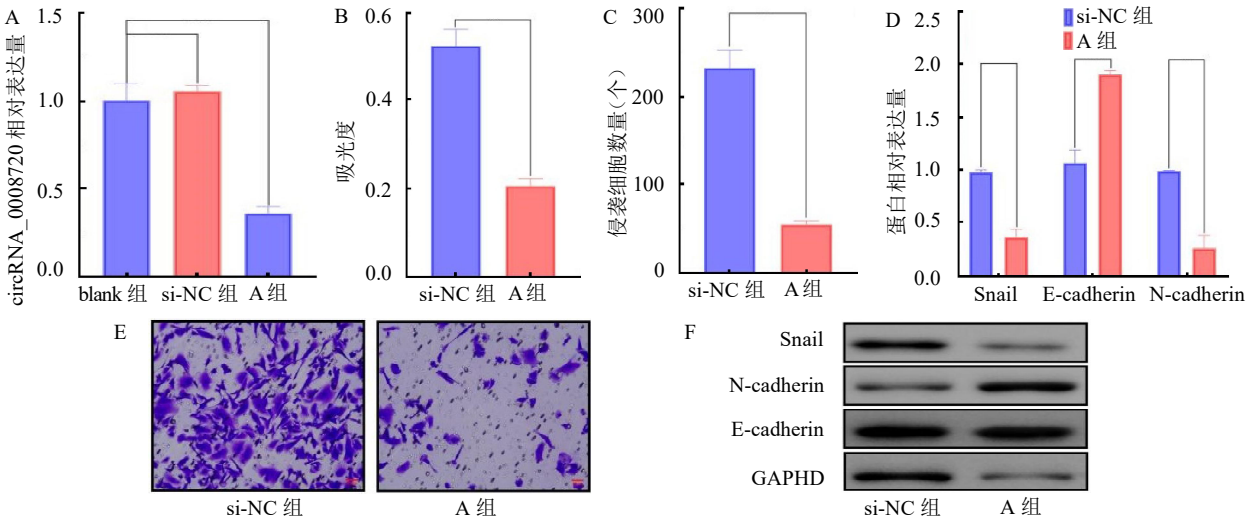
2.5　miR-138-5p 抑制剂能部分逆转 si-circRNA_0008720 对 MDA-MB-231 细胞的生物学效应　对 circRNA_0008720 通过吸附 miR-138-5p 调控乳腺癌细胞的生物学效应进行研究，结果表明转染 si-circRNA_0008720 对乳腺癌细胞的 EMT 进程和增殖侵袭活性均有抑制作用，该效应能够被 si-miR-138-5p 部分逆转（均 $P < 0.05$），见图 4。

2.6　过表达 SOX4 能部分逆转 si-circRNA_0008720 对 MDA-MB-231 细胞的生物学效应　转染 si-circRNA_0008720 后对乳腺癌细胞 EMT 进程和增殖侵袭活性均有抑制作用，该效应能够被过表达 SOX4 部分逆转（均 $P < 0.05$），见图 5。



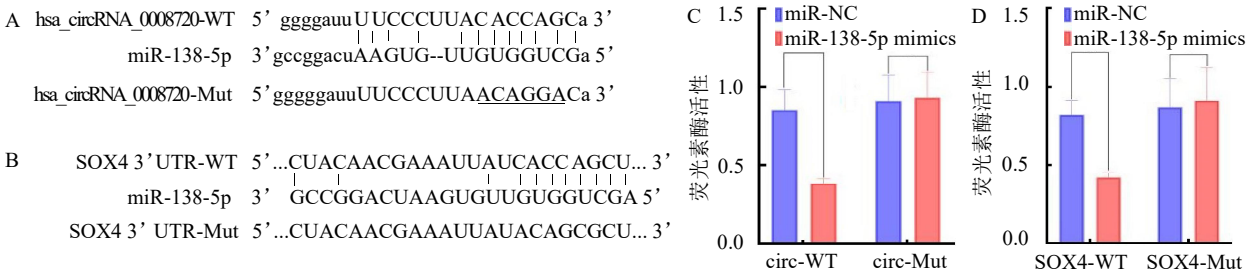
注：A 为 circRNA_0008720 在乳腺癌及其癌旁组织中的表达水平；B 为 miR-138-5p 在乳腺癌及其癌旁组织中的表达水平；C 为 SOX4 在乳腺癌及其癌旁组织中的表达水平；D 为 circRNA_0008720 诊断乳腺癌的 ROC 曲线

图 1　乳腺癌及其癌旁组织中 circRNA_0008720、miR-138-5p、SOX4 的表达



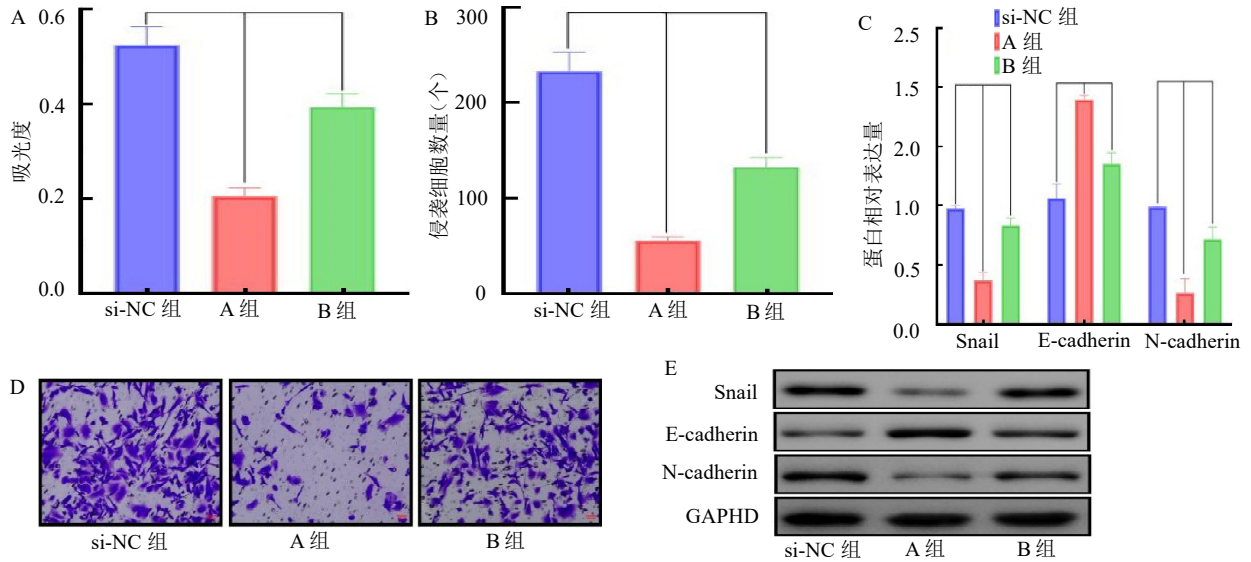
注：A 为 blank 组、si-RNA 组、A 组中 circRNA_0008720 的表达水平比较；B 为 si-NC 组、A 组细胞增殖情况；C、E 为 si-NC 组、A 组的细胞侵袭情况；D、F 为 Snail、E-cadherin、N-cadherin 在 si-NC 组、A 组中的表达水平

图 2　circRNA_0008720 表达水平对乳腺癌细胞的增殖、侵袭和 EMT 的影响



注：A 为 circRNA_0008720 和 miR-138-5p 互补结合序列；B 为 SOX4 和 miR-138-5p 互补结合序列；C ～ D 为萤光素酶报告实验

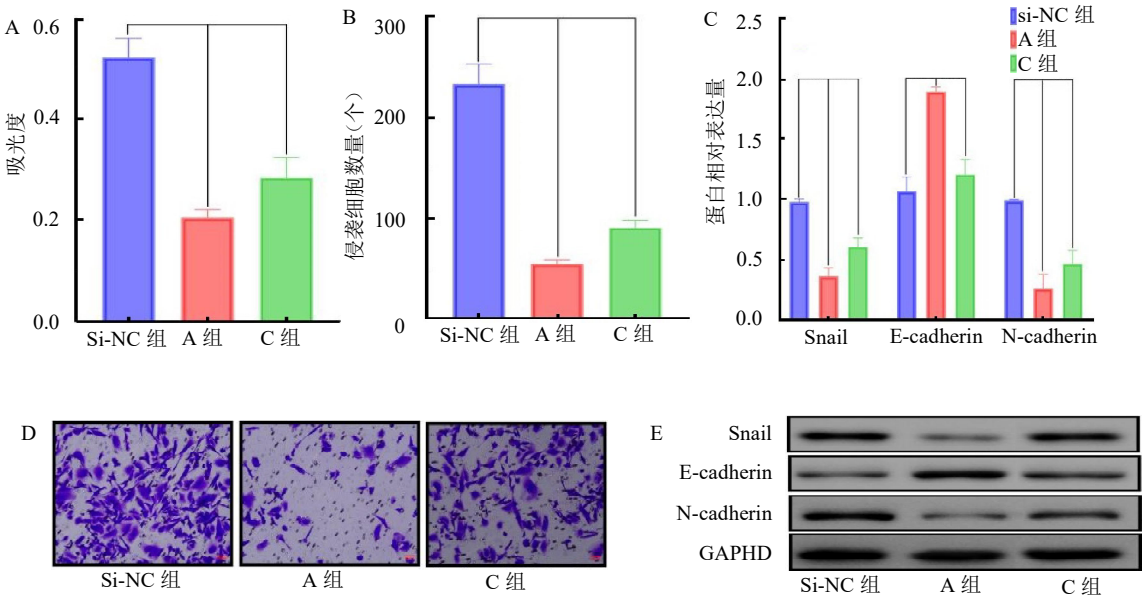
图 3　靶向结合区和荧光素酶报告实验



注：A 为 si-NC 组、A 组、B 组细胞增殖情况；B、D 为 si-NC 组、A 组、B 组细胞侵袭情况；C、E 为 Snail、E-cadherin、N-cadherin 分别在 si-NC 组、A 组、B 组中的表达水平

图 4　miR-138-5p 抑制剂能部分逆转 si-circRNA_0008720 对 MDA-MB-231 细胞的生物学效应

2.7　乳腺癌 SOX4 基因表达与 EMT 通路相关性分析　从癌症基因组图谱（TCGA）数据库（https://portal.gdc.com）中收集乳腺癌相关数据，通过计算 SOX4 基因相对表达量（X 轴）与 EMT 通路评分（Y



注：A 为 si-NC 组、A 组、C 组细胞增殖情况；B、D 为 si-NC 组、A 组、C 组中细胞侵袭情况；C、E 为 Snail、E-cadherin、N-cadherin 分别在 si-NC 组、A 组、C 组中的表达水平

图 5　过表达 SOX4 能部分逆转 si-circRNA_0008720 对 MDA-MB-231 细胞的生物学效应

轴）的相关性，结果显示乳腺癌 SOX4 基因的过表达与 EMT 程度呈正相关（r=0.28，P ＜ 0.05），见图 6。

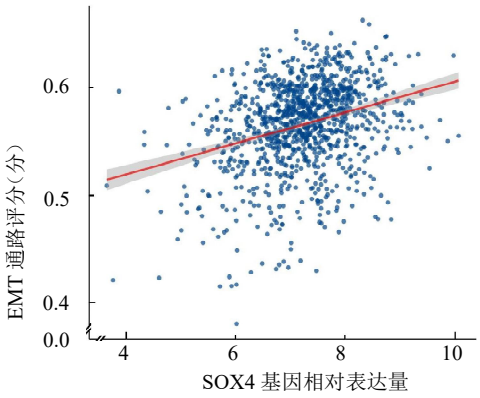


图 6　乳腺癌 SOX4 基因表达与 EMT 通路相关性

3　讨论

circRNAs 是目前生命科学领域研究的热点，能通过调控相关靶基因和信号路径，广泛参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭等多种生物学行为，并且可作为潜在标志物用于乳腺癌临床辅助诊断和预后风险评估，具有重要的临床价值和应用前景[5]。

miRNAs 是一类广泛存在于真核细胞中的短小单链、非编码 RNA，circRNAs 作为分子海绵能通过吸附 miRNAs 来调控靶基因的表达，影响细胞增殖、分化及信号转导，改变肿瘤组织微环境[6]。通过本团队前期研究，本文选择 circRNA_0008720 作为研究对象。通过 circRNA 的数据库（http://www.circRNAbase.org/）发现 GRCh37 是 circRNA_0008720 的宿主基因，位于 chr9（98740342-98766983），长度为 26641nt，circRNA_0008720 由 GRCh37 基因上第 11、12、13 个外显子首尾相接形成的闭合环状结构，荧光素酶报告实验表明 miR-138-5p 与 circRNA_0008720、SOX4 之间存在靶向结合作用关系。miR-138-5p 是多种肿瘤细胞中下调最多的 miRNA 之一，提高 miR-138-5p 表达可抑制包括胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、胶质瘤在内的癌细胞侵袭效应[7-8]。有研究表明 SOX4 蛋白过表达是导致乳腺癌预后欠佳的重要因素，并且与临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移密切相关，但对于 SOX4 在乳腺癌中的调控机制知之甚少[9]。有研究报道 TGF-β 通过刺激 SOX4 在人乳腺上皮细胞中的异位过表达，获得侵袭性间充质细胞特性，重组编排表观基因，从而诱导 EMT 进程和癌细胞的迁移、侵袭[10-11]。同时研究还发现基于 Snail 调节因子诱导的 EMT 进程能够维持肿瘤干细胞样表型，增强癌细胞的成球能力、化学抗性和侵袭能力[12]。本研究结果显示 SOX4 的过表达可以促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭和 EMT 进程，通过计算通路相关性得分显示 SOX4 的过表达与 EMT 呈正相关。

本研究通过生物信息学分析和荧光素酶报告实

验证实 circRNA_0008720 可作为分子海绵吸附 miR-138-5p，SOX4 是 miR-138-5p 下游靶点，下调 circRNA_0008720 可通过促进 miR-138-5p 来抑制 SOX4 信号转导，从而抑制乳腺癌的 EMT 进程和增殖侵袭活性，此调控机制有望为诊断和治疗乳腺癌提供新的靶点。本研究尚存在不足，需进一步分析 circRNA_0008720 与乳腺癌患者的预后关系，探讨其作为乳腺癌潜在标志物的可行性。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 乔恩奇：数据整理、论文撰写、经费支持；曹杰：实验操作、统计学分析；王佳：实验操作、数据收集、统计学分析；陈道宝、王春雷：研究指导、论文修改

参 考 文 献

[1] 梁锌,杨剑,高婷,等.全球女性乳腺癌发病趋势及年龄变化情况分析[J].中华肿瘤杂志,2023,45(4):313-321.

[2] SANG M J, WU M, MENG L J, et al. Identification of epithelial-mesenchymal transition-related circRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network in breast cancer[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216 (9): 153088.

[3] SEO J, HA J, KANG E, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition-regulating transcription factors in anti-cancer drug resistance[J]. Arch Pharm Res, 2021, 44(3): 281-292.

[4] TANG S C, LION Q, PEULEN O, et al. The E3 ligase COP1 promotes ERα signaling and suppresses EMT in breast cancer[J]. Oncogene, 2022, 41(2): 173-190.

[5] YANG L, CHEN Y X. Circ_0008717 sponges miR-326 to elevate GATA6 expression to promote breast cancer tumorigenicity[J]. Biochem Genet, 2023, 61(2): 578-596.

[6] RUPAIMOOLE R, YOON B, ZHANG W C, et al. A high-throughput small molecule screen identifies ouabain as synergistic with miR-34a in killing lung cancer cells[J]. iScience, 2020, 23(2): 100878.

[7] ZHANG D P, LIU X D, ZHANG Q W, et al. MiR-138-5p inhibits the malignant progression of prostate cancer by targeting FOXC1[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 297.

[8] TIAN S, GUO X J, YU C, et al. MiR-138-5p suppresses autophagy in pancreatic cancer by targeting SIRT1[J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11071-11082.

[9] SONG Z W, ZHANG X, LIN Y, et al. LINC01133 inhibits breast cancer invasion and metastasis by negatively regulating SOX4 expression through EZH2[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11): 7554-7565.

[10] ZHANG J C, LIANG Q, LEI Y, et al. SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression[J]. Cancer Res, 2012, 72(17): 4597-4608.

[11] PARVANI J G, SCHIEMANN W P. Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of breast cancers: Mastering the Masters of EMT[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(4): R72.

[12] OTA I, MASUI T, KURIHARA M, et al. Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 261-266.

收稿日期：2024-05-08

（本文编辑：吴迪汉）