

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220230

· 论 著 ·

环状 RNA circNEIL3 高表达促进乳腺癌细胞增殖

陈 航^{1,2}, 李墨林³, 陈 义^{2*}

1. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室, 重庆 400016

2. 四川省达州市万源市中心医院外二科, 达州 636350

3. 重庆医科大学生命科学研究院骨发育与再生实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探究环状 RNA circNEIL3 在乳腺癌中的表达、生物学功能及其对细胞周期相关蛋白表达的影响。**方法** 收集 50 例经病理证实的乳腺癌患者的临床病理资料及乳腺癌组织和癌旁正常组织样本。采用环状 RNA 测序分析 3 对乳腺癌组织与癌旁正常组织的差异表达环状 RNA, 利用 RNA 酶消化实验和核质分离实验验证差异表达环状 RNA circNEIL3 的特征。采用 qPCR 检测 circNEIL3 在乳腺癌组织和细胞中的表达, 分析 circNEIL3 表达与患者临床病理资料的关系。采用 CCK-8 实验和集落形成实验检测 circNEIL3 对 BT-549 和 MCF-7 细胞增殖的影响, 运用流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期变化, 采用蛋白质印迹法检测细胞周期蛋白 D1 (CCND1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 4、细胞周期蛋白 E1 (CCNE1) 和 CDK2 蛋白的表达水平。**结果** 乳腺癌组织与癌旁正常组织中差异表达的 circNEIL3 不易被 RNA 酶 R 降解, 其主要分布于乳腺癌细胞的细胞质中。与癌旁正常乳腺组织及细胞相比, 乳腺癌组织和细胞中 circNEIL3 的表达水平均增高 (均 $P < 0.05$)。肿瘤最大径 > 2 cm 和高 TNM 分期 (Ⅲ期) 的乳腺癌患者多表现为 circNEIL3 高表达 (均 $P < 0.05$)。circNEIL3 过表达可增强乳腺癌细胞增殖活性, 并上调 CCND1、CDK4、CCNE1 和 CDK2 的蛋白表达水平 (均 $P < 0.05$)。敲低 circNEIL3 可诱导乳腺癌细胞凋亡 ($P < 0.01$), 导致细胞周期阻滞于 G1 期 ($P < 0.01$)。**结论** 乳腺癌组织和细胞中高表达的 circNEIL3 可通过调控细胞周期相关蛋白的表达促进乳腺癌细胞增殖。

[关键词] 乳腺肿瘤; circNEIL3; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

[引用本文] 陈航, 李墨林, 陈义. 环状 RNA circNEIL3 高表达促进乳腺癌细胞增殖 [J]. 海军军医大学学报, 2024, 45 (6): 725-731. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220230.

High expression of circular RNA circNEIL3 promotes proliferation of breast cancer cells

CHEN Hang^{1,2}, LI Molin³, CHEN Yi^{2*}

1. Department of Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Surgery (II), The Central Hospital of Wanyuan, Dazhou 636350, Sichuan, China

3. Laboratory of Bone Development and Regeneration, Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression and function of circular RNA (circRNA) circNEIL3 in breast cancer (BC) and its influence on the expression levels of cell cycle-related proteins. **Methods** Clinical and pathological data from 50 patients with pathologically confirmed BC, along with samples of their BC tissues and para-cancer tissues were collected. circRNA sequencing was used to analyze the differentially expressed circRNAs in 3 pairs of BC tissues and para-cancer tissues. The characteristic of differentially expressed circRNA circNEIL3 was verified by ribonuclease (RNase) digestion and cytoplasmic/nuclear fractionation experiments. The expression of circNEIL3 in BC tissues and cells was detected by quantitative polymerase chain reaction. The relationship between circNEIL3 expression and the patients' clinicopathological data was also analyzed. The effect of circNEIL3 on proliferation of BT-549 and MCF-7 cells was identified by cell counting kit 8 and colony-formation assays. The changes of cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The expression levels of cyclin D1 (CCND1), cyclin-dependent kinase (CDK) 4, cyclin E1 (CCNE1) and CDK2 were measured by Western blotting. **Results** circNEIL3 differentially expressed in BC tissues and adjacent tissues was not easily degraded by RNase R and mainly located in the cytoplasm of BC cells. Compared with normal breast tissues and cells, the expression levels of circNEIL3 in BC tissues and cells were significantly up-regulated (all $P < 0.05$). circNEIL3 was highly expressed in BC patients with tumor maximum diameter > 2 cm and at high TNM stage (stage III) (both $P < 0.05$). Overexpression

[收稿日期] 2022-03-18 [接受日期] 2022-07-01

[作者简介] 陈 航, 博士生. E-mail: 1041523161@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 081-88604050, E-mail: 51295673@qq.com

of circNEIL3 enhanced proliferation of BC cells and up-regulated the levels of CCND1, CDK4, CCNE1 and CDK2 (all $P < 0.05$). Knockdown of circNEIL3 induced cell apoptosis ($P < 0.01$), resulting in cell cycle arrest at G1 phase ($P < 0.01$).

Conclusion High expression of circNEIL3 in BC tissues and cells can promote the proliferation of BC cells by up-regulating the expression levels of cycle-related proteins.

[**Key words**] breast neoplasms; circNEIL3; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

[**Citation**] CHEN H, LI M, CHEN Y. High expression of circular RNA circNEIL3 promotes proliferation of breast cancer cells[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(6): 725-731. DOI: 10.16781/j.cn31-2187/R.20220230.

乳腺癌是女性最常被诊断出的恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。乳腺癌易受激素紊乱、遗传、环境和表观遗传突变等因素影响,其发病和进展机制尚不明确,防治仍未取得根本性突破^[2-3],迫切需要进一步探究乳腺癌发生、发展的分子机制。

环状RNA是一类通过反向剪接形成的共价闭环状转录本,结构稳定,在生物体内表达丰富,并通过多种机制广泛地调控疾病的发生和发展^[4-5]。近年来随着测序技术的发展,一些环状RNA被发现在疾病中具有生物学意义^[6-8]。本研究通过环状RNA测序分析乳腺癌组织及癌旁正常组织中差异表达的环状RNA,并选择乳腺癌组织和癌旁正常组织中差异表达最显著的环状RNA hsa_circ_0001460 [chr4:178274462-178281831, 其亲本基因为Nei核酸内切酶Ⅷ样蛋白3 (Nei endonuclease Ⅷ like protein 3, NEIL3), 故命名为circNEIL3]为研究对象,探究其在乳腺癌中的表达、生物学功能和分子调控机制。

1 材料和方法

1.1 临床样本 收集2019年3月至2021年4月在四川省达州市万源市中心医院行手术治疗的50例乳腺癌患者的乳腺癌组织及癌旁正常组织,所有组织在切除后立即放入RNA保存液中,然后放置于-80℃冰箱备用。所有患者术前均未行化疗或放疗,且术后病理证实为乳腺癌。收集患者临床信息,包括年龄、绝经情况、病理分级、肿瘤大小、肿瘤淋巴结转移分期。所有患者均签署知情同意书。本研究经四川省达州市万源市中心医院伦理委员会审批。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM和RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;MEGM培养基购自瑞士Lonza公司;FBS购自美国PAN公司;TRIzol和Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司;核

质分离PARIS™试剂盒购自美国Life Technologies公司;RNA酶R(RNase R)购自美国Epicentre Biotechnologies公司;反转录试剂盒与qPCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;CCK-8试剂盒购自汉恒生物科技(上海)有限公司;circNEIL3过表达质粒(circN3OE)、对照质粒(vector)、siRNA(si-circNEIL3)和阴性对照siRNA(si-nc)购自金开瑞生物工程(武汉)有限公司;总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE试剂盒和PVDF膜购自碧云天生物技术(上海)有限公司;细胞周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1)抗体、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)4抗体、细胞周期蛋白E1(cyclin E1, CCNE1)抗体、CDK2抗体、β-肌动蛋白抗体和HRP标记二抗购自美国Santa Cruz公司;SW-9800型超净工作台购自苏州泰安空气技术有限公司;PCR反转录仪、CFX96™实时荧光qPCR仪、蛋白垂直电泳电转系统、FACSCanto II流式细胞仪购自美国Bio-Rad公司;酶标仪购自美国ThermoFisher公司。

1.3 环状RNA测序 提取3对乳腺癌组织及癌旁正常组织的总RNA并检测其完整度、浓度和纯度。所得总RNA经质检合格后进行后续实验,由上海康成生物技术有限公司对总RNA进行环状RNA测序分析。

1.4 细胞培养及转染 人正常乳腺细胞及人乳腺癌细胞由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心提供。以上细胞使用适合的MEGM、DMEM或RPMI 1640培养基进行培养,细胞放置于37℃、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱内培养。将处于对数生长期的细胞按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行转染。转染48h后收集细胞检测转染效率,用于后续实验。转染vector、circN3OE、si-nc和si-circNEIL3的细胞被分别命名为vector组、circN3OE组、si-nc组和si-circNEIL3组。

1.5 RNA提取、反转录及qPCR 使用TRIzol试剂提取组织和细胞中的RNA,按照反转录试剂盒说明书将其反转录为cDNA,以cDNA为模板,使用CFX96™实时荧光qPCR仪进行PCR扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算RNA的相对表达量。引物序列如下: *circNEIL3* 正义引物 5'-GCAGTTT-TATGCCTGTCCTCTACCT-3', 反义引物 5'-CTTC-ACTCTTGAGCACTGAATTTCA-3'; *NEIL3* 正义引物 5'-CAAGCGTCCTAATTGTGGTCA, 反义引物 5'-CCCTGCTAGATGTCCAAGTATT-3'; β -肌动蛋白正义引物 5'-GATTCCTATGTGGGCGACGA-3', 反义引物 5'-TGTAGAAGGTGTGGTGCCAG-3'; *U6* 正义引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反义引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'^[9]。

1.6 核质分离实验 按照核质分离 PARIS™ 试剂盒说明书提取MCF-7细胞的细胞核和细胞质RNA,使用反转录试剂盒将相应的RNA反转录为cDNA,利用qPCR检测细胞核和细胞质中RNA表达量。

1.7 RNA酶消化实验 使用TRIzol试剂提取细胞中的RNA,取2 μ g RNA和RNase R (4 U/ μ g) 轻柔混匀后,于37 °C条件下处理20 min。使用反转录试剂盒反转录相应的RNA为cDNA,利用qPCR检测样本中RNA的表达情况。

1.8 CCK-8实验 取转染48 h后的BT-549和MCF-7细胞,将每组细胞制成密度为 2×10^4 /mL的细胞悬液,按每孔100 μ L接种于96孔板中,每组设置3个复孔。于0、24、48和72 h时每孔分别加入10 μ L CCK-8溶液,在细胞培养箱中孵育1.5 h后,于450 nm处测量光密度值。

1.9 集落形成实验 取转染48 h后的BT-549和MCF-7细胞(1×10^3 /孔),接种于6孔板中,置于细胞培养箱中培养2周后,利用4%多聚甲醛固定20 min,弃多聚甲醛,加入0.1%结晶紫染色液染色15 min,轻轻漂洗掉染色液,室温晾干后拍照,进行集落计数。

1.10 流式细胞术 取转染48 h后的MCF-7细胞,室温避光条件下以膜联蛋白V/PI对细胞进行10 min染色,使用流式细胞仪测量凋亡细胞。另取转染48 h后的MCF-7细胞,使用70%的乙醇于4 °C条件下固定细胞12 h,短暂离心后弃乙醇,经PBS洗涤后,在室温避光条件下使用聚酰亚胺溶液处理30 min,使用流式细胞仪测量细胞周期分布情况。

1.11 蛋白质印迹法 收集转染48 h后的BT-549和MCF-7细胞,使用RIPA裂解液充分裂解细胞并提取细胞总蛋白,每孔上样15 μ g蛋白质样品,电泳待目的条带分开后切胶,210 mA恒流转膜。取膜在室温下用8%脱脂牛奶封闭2 h,然后4 °C条件下加入一抗(稀释比例为CCND1抗体1 : 2 000、CDK4抗体1 : 2 000、CCNE1抗体1 : 3 000、CDK2抗体1 : 3 000和 β -肌动蛋白抗体1 : 2 000)孵育过夜;然后室温孵育二抗(稀释比例为1 : 8 000)2 h。使用ECL试剂盒进行化学发光显影,用Quantity One对图像进行半定量分析。

1.12 统计学处理 应用SPSS 20.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两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。计数资料以频数表示,采用 χ^2 检验分析*circNEIL3*表达量与患者临床病理指标的关系。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 差异表达的环状RNA 对3对乳腺癌组织和癌旁正常组织进行环状RNA测序,相对于癌旁正常组织,在乳腺癌组织中31个环状RNA表达上调、51个环状RNA表达下调。其中*circNEIL3* (*hsa_circ_0001460*) 在乳腺癌组织中上调倍数最高(图1)。

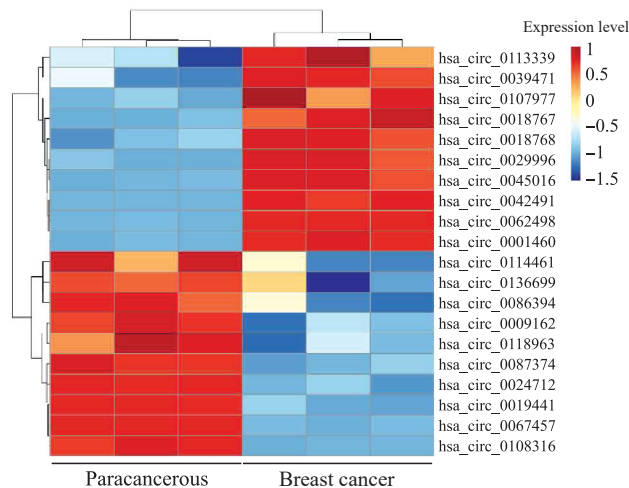


图1 乳腺癌组织和癌旁正常组织中部分差异表达的环状RNA热图

Fig 1 Heat map of differentially expressed circular RNAs in breast cancer tissue and paracancerous tissue

2.2 circNEIL3环状结构及稳定性 *circNEIL3*由*NEIL3*基因的第8、9号外显子环化而成(图2A),

因此命名为 circNEIL3。RNA 酶消化实验结果 (图 2B) 显示, 与未处理的 RNA 相比, RNase R 处理的 RNA 样品中 NEIL3 与 β -肌动蛋白 mRNA 的表达丰度降低 (均 $P < 0.01$), 而 circNEIL3 在

两组间的表达差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。circNEIL3 在 MCF-7 细胞中的分布情况如图 2C 所示, circNEIL3 主要位于细胞质中。

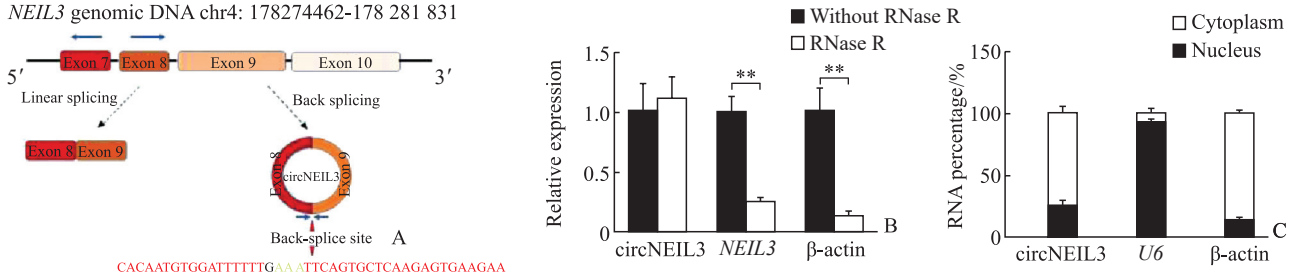


图 2 circNEIL3 的结构及其在 MCF-7 细胞中的特征

Fig 2 Structure of circNEIL3 and its characteristics in MCF-7 cells

A: Schematic illustration of human circNEIL3. B: RNA expression in breast cancer cells was detected after RNase R treatment. $**P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. C: The cellular localization of circNEIL3 was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction. NEIL3: Nei endonuclease VIII like protein 3; RNase R: Ribonuclease R.

2.3 circNEIL3 的表达及其与临床病理指标的关系 乳腺癌组织中 circNEIL3 的表达水平高于癌旁正常组织 (1.85 ± 1.21 vs 1.00 ± 0.27 , $P < 0.01$)。与 MCF-10A 细胞 (1.02 ± 0.24) 相比, BT-549 (2.73 ± 0.57)、MDA-MB-231 (3.01 ± 0.70)、MDA-MB-468 (2.91 ± 0.40)、BT-483 (4.22 ± 0.75)

和 MCF-7 (6.28 ± 1.30) 细胞中 circNEIL3 表达水平平均上调 (均 $P < 0.05$)。如表 1 所示, 肿瘤最大径 > 2 cm 和高 TNM 分期 (III 期) 的乳腺癌患者多表现为 circNEIL3 高表达 (均 $P < 0.05$), 表明 circNEIL3 与乳腺癌关系密切。

表 1 50 例乳腺癌患者临床病理特征与 circNEIL3 表达的关系

Tab 1 Correlation between circNEIL3 expression and clinicopathological features in 50 breast cancer patients

Characteristic	Total N=50	circNEIL3 expression		χ^2 value	P value
		Low N=24	High N=26		
Age/year				0.349	0.584
<50	23	10	13		
≥ 50	27	14	13		
Menopausal				0.321	0.778
Pre-menopausal	25	11	14		
Postmenopausal	25	13	12		
Histopathological grade				0.935	0.388
I - II	32	17	15		
III	18	7	11		
Tumor maximum diameter/cm				5.059	0.046
≤ 2	23	15	8		
> 2	27	9	18		
T stage				0.742	0.413
1-2	24	10	14		
3-4	26	14	12		
TNM stage				7.962	0.009
I - II	21	15	6		
III	29	9	20		

2.4 过表达及敲低 circNEIL3 的乳腺癌细胞模型构建 在 BT-549 细胞中转染 vector 和 circN3OE,

circNEIL3 的相对表达量在 vector 组和 circN3OE 组中分别为 1.04 ± 0.38 和 8.43 ± 2.02 , 提示 circNEIL3

表达上调 ($P < 0.01$)；在 MCF-7 细胞中转染 si-nc 和 si-circNEIL3, si-nc 组和 si-circNEIL3 组中 circNEIL3 的相对表达量分别为 1.01 ± 0.19 和 0.37 ± 0.06 , 提示 circNEIL3 表达下调 (均 $P < 0.01$)。同时, vector、circN3OE、si-nc 和 si-circNEIL3 组中 circNEIL3 的亲本线性基因 NEIL3 相对表达量分别为 1.04 ± 0.39 、 1.07 ± 0.58 、 1.03 ± 0.27 和 1.03 ± 0.67 , 4 组间差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

2.5 circNEIL3 促进乳腺癌细胞增殖 CCK-8 实验结果显示, 转染 circN3OE 的 BT-549 细胞转染

72 h 时增殖活性较 vector 组细胞升高 ($P < 0.01$, 图 3A), 而转染 si-circNEIL3 的 MCF-7 细胞转染 72 h 时增殖活性较 si-nc 组细胞降低 ($P < 0.01$, 图 3B)。集落形成实验结果支持 CCK-8 实验结果, 转染 circN3OE 的 BT-549 细胞集落数较 vector 组增加 (161.67 ± 6.11 vs 118.67 ± 14.22 , $P < 0.01$; 图 3C), 而转染 si-circNEIL3 的 MCF-7 细胞集落数较 si-nc 组减少 (56.00 ± 6.56 vs 132.33 ± 7.51 , $P < 0.01$; 图 3D)。

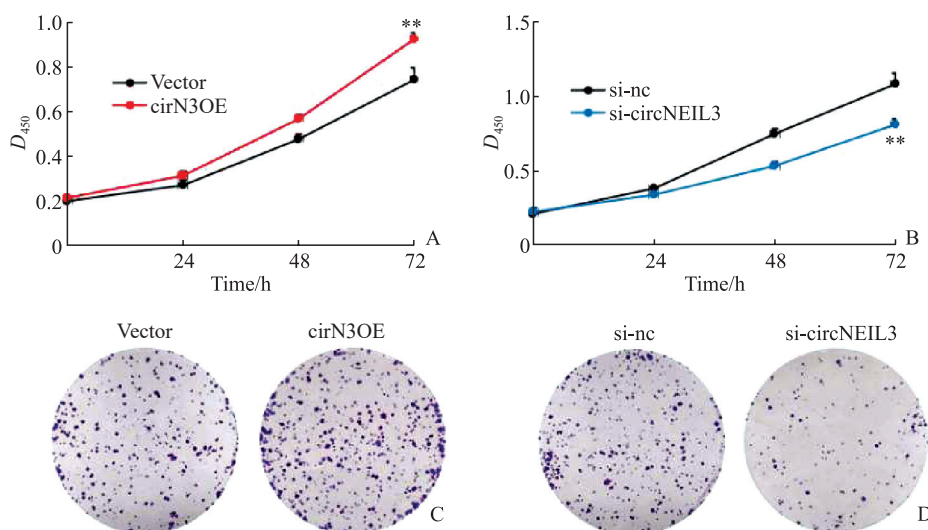


图3 CCK-8 实验和集落形成实验检测 circNEIL3 对乳腺癌细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of circNEIL3 on proliferation of breast cancer cells determined by CCK-8 and colony-formation assays A, B: The growth curves of breast cancer cells BT-549 (A) and MCF-7 (B) were measured using CCK-8 assay. ** $P < 0.01$ vs vector/si-nc group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. C, D: The proliferation of breast cancer cells BT-549 (C) and MCF-7 (D) was detected by colony-formation assay. CCK-8: Cell counting kit 8; circN3OE: circNEIL3 overexpression plasmid; si-nc: Negative control small interfering RNA; si-circNEIL3: Specific small interfering RNA targeting circNEIL3.

2.6 敲低 circNEIL3 可促进细胞凋亡和细胞周期阻滞 流式细胞术结果显示, 与对照组相比, 在乳腺癌细胞 MCF-7 中敲低 circNEIL3 的表达可提高细胞早期凋亡率 [$(19.53 \pm 0.91) \%$ vs $(5.20 \pm 0.30) \%$, $P < 0.01$; 图 4A], 表明敲低 circNEIL3 可促进细胞凋亡。细胞周期检测结果显示, 敲低 circNEIL3 的表达可增高 G1 期细胞百分比、降低 S 期细胞百分比 (均 $P < 0.01$, 图 4B), 表明敲低 circNEIL3 导致细胞周期阻滞于 G1 期。

2.7 circNEIL3 影响周期相关蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结果显示, 在 BT-549 细胞中转染 circN3OE 后, 细胞中 CCND1、CDK4、CCNE1 和 CDK2 蛋白表达水平均升高 (均 $P < 0.05$); 而在 MCF-7 细胞中转染 si-circNEIL3 后, 细胞中

CCND1、CDK4、CCNE1 和 CDK2 蛋白表达水平均降低 (均 $P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

越来越多的证据表明环状 RNA 对基因表达具有重要的调控能力^[5,7]。目前环状 RNA 在生物体内的表达及生物学功能得到广泛研究, 尤其是在肿瘤的进展、转移、凋亡、自噬等领域^[5-6]。研究显示环状 RNA 主要作为 miRNA 海绵调节下游靶基因表达, 进而发挥相应的生物学功能, circ-MET (hsa_circ_0082002) 在肝细胞癌中高表达, 并通过 miRNA-30-5p/snail/ 二肽基肽酶 4 轴促进肝细胞癌发展, 产生对抗程序性死亡受体 1 治疗的耐药性^[6]。同时环状 RNA 可以同蛋白质结合并影响其

稳定性或功能,环状RNA-SORE(一种在耐索拉非尼肝细胞癌细胞中上调的环状RNA)与致癌蛋白Y-框结合蛋白1(Y-box binding protein 1, YBX1)结合,阻止YBX1与E3泛素连接酶pre-mRNA加工因子19(pre-mRNA processing factor 19, PRP19)相互作用,从而阻止PRP19对YBX1的泛素化降

解,最终导致肝细胞癌对索拉非尼产生耐药性^[5]。值得注意的是,环状RNA还可以充当蛋白质翻译模板而调节生理相关过程,circ-ZNF609(一种在鼠和人类成肌细胞中表达的环状RNA)能以依赖剪接和不依赖帽的方式翻译成蛋白质,特异性控制成肌细胞增殖^[8]。

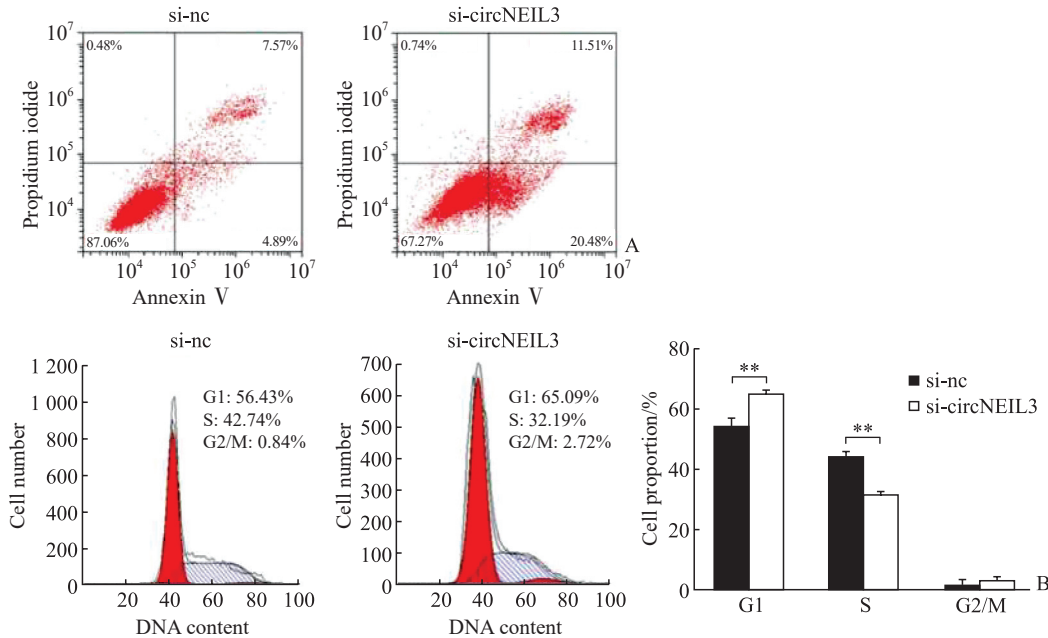


图4 流式细胞术分析 circNEIL3 对乳腺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞的影响

Fig 4 Effects of circNEIL3 on apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells analyzed by flow cytometry

A: The apoptosis of MCF-7 cells transfected with si-nc or si-circNEIL3; B: The cell cycle of MCF-7 cells transfected with si-nc or si-circNEIL3.

** $P < 0.01$. $n = 3, \bar{x} \pm s$. si-nc: Negative control small interfering RNA; si-circNEIL3: Specific small interfering RNA targeting circNEIL3.

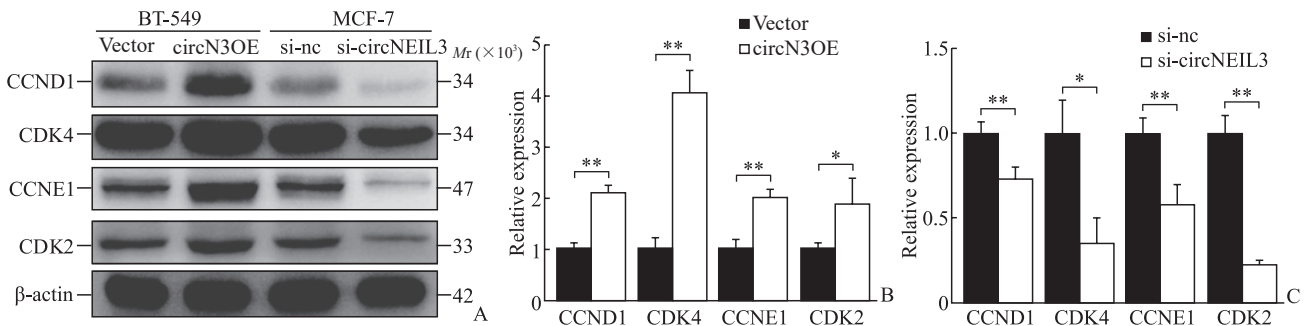


图5 蛋白质印迹法检测 circNEIL3 对乳腺癌细胞中细胞周期相关蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of circNEIL3 on expression of cell cycle-related proteins in breast cancer cells detected by Western blotting

A: Results of Western blotting; B: The levels of cell cycle-related proteins in breast cancer cells BT-549 transfected with vector plasmids or circN3OE; C: The levels of cell cycle-related proteins in breast cancer cells MCF7 transfected with si-nc or si-circNEIL3.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3, \bar{x} \pm s$. circN3OE: circNEIL3 overexpression plasmid; si-nc: Negative control small interfering RNA; si-circNEIL3: Specific small interfering RNA targeting circNEIL3; CCND1: Cyclin D1; CDK: Cyclin-dependent kinase; CCNE1: Cyclin E1.

StarBase 数据库 (<http://www.circbase.org/>) 提示 circNEIL3 (chr4:178274462-178281831) 源于 NEIL3 基因座中的外显子区域,由外显子 8 和外显子 9 环化形成,该区域位于染色体 4q34.3。研

究表明, circNEIL3 在多种恶性肿瘤中表达上调,并促进多种癌细胞的恶性表型。其在宫颈癌中高表达,通过作为竞争性内源 RNA 与 miRNA-137 竞争性结合间接上调 Krüppel 样因子 12 的表达,促

进宫颈癌细胞增殖^[10]。在肝细胞癌中表达上调的 circNEIL3 通过 miRNA-3150b-3p/层粘连蛋白 γ 1 亚基促进肝细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭^[11]。此外, circNEIL3 能通过 miRNA-432-5p/RNA 特异性腺苷脱氨酶 1/胶质瘤相关癌基因同源物 1 和上皮-间质转换轴调控胰腺导管腺癌增殖和转移^[9]。而 circNEIL3 在乳腺癌中的表达及生物学功能、分子机制未见报道。本研究发现 circNEIL3 在乳腺癌组织和细胞中稳定高表达,且 circNEIL3 的异常高表达与肿瘤大小、TNM 分期相关。体外细胞功能实验结果提示,过表达 circNEIL3 可促进乳腺癌细胞的增殖活性和集落形成,而敲低 circNEIL3 可降低乳腺癌细胞的增殖活性和集落形成,促进细胞凋亡并使细胞周期阻滞在 G1 期。

细胞周期进程调节因子 CCND1 与 CDK4 或 CDK6 形成复合体,与 CCNE1/CDK2 复合体一起磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白,使 E2F 转录因子被激活并通过调节特定基因的转录促进细胞增殖^[12]。Shen 等^[9]报道 circNEIL3 可以调控胰腺导管腺癌细胞中 CCND1 和 CDK4 等细胞周期蛋白的表达,而且 CDK4/6 抑制剂已被批准用于 CDK4/6 阳性乳腺癌亚型的治疗^[13]。本实验检测了 circNEIL3 对乳腺癌细胞中部分细胞周期蛋白表达的影响,结果显示过表达 circNEIL3 可上调 CCND1、CDK2、CCNE1 和 CDK4 的表达,而敲低 circNEIL3 则产生相反的作用,说明 circNEIL3 可通过影响细胞周期相关蛋白表达促进乳腺癌细胞增殖。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21387.
- [2] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- [3] GINSBURG O, BRAY F, COLEMAN M P, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health[J]. *Lancet*, 2017, 389(10071): 847-860. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31392-7.
- [4] 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.
- [5] XU J, JI L, LIANG Y, et al. CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 298. DOI: 10.1038/s41392-020-00375-5.
- [6] HUANG X Y, ZHANG P F, WEI C Y, et al. Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p/snail/DPP4 axis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 92. DOI: 10.1186/s12943-020-01213-6.
- [7] LIANG G, LING Y, MEHRPOUR M, et al. Autophagy-associated circRNA circCDYL augments autophagy and promotes breast cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 65. DOI: 10.1186/s12943-020-01152-2.
- [8] LEGNINI I, TIMOTEO G D, ROSSI F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37.e9. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.017.
- [9] SHEN P, YANG T, CHEN Q, et al. CircNEIL3 regulatory loop promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via miRNA sponging and A-to-I RNA-editing[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 51. DOI: 10.1186/s12943-021-01333-7.
- [10] CHEN Y, GENG Y, HUANG J, et al. CircNEIL3 promotes cervical cancer cell proliferation by adsorbing miR-137 and upregulating KLF12[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 34. DOI: 10.1186/s12935-020-01736-4.
- [11] LI Z, ZHANG J, JIANG Y, et al. Circular ribonucleic acid Nei-like deoxyribonucleic acid glycosylase 3 governs the microribonucleic acid-3150b-3p/laminin subunit gamma 1 network to partially promote the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2021, 51(6): 702-714. DOI: 10.1111/hepr.13636.
- [12] MONTALTO F I, AMICIS F D. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2648. DOI: 10.3390/cells9122648.
- [13] XUE Y, MEEHAN B, MACDONALD E, et al. CDK4/6 inhibitors target SMARCA4-determined cyclin D1 deficiency in hypercalcemic small cell carcinoma of the ovary[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 558. DOI: 10.1038/s41467-018-06958-9.

[本文编辑] 尹 茶