

circ_0044556 靶向调控 miR-338-3p/BRD4 轴对三阴性乳腺癌细胞恶性生物学行为的调节作用及其分子机制

董兴娟, 张亚丽, 兴伟, 朱莹莹, 程永里, 于萍*

河北省中医院普外科, 河北石家庄 050000

[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0766.2025.0527

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 董兴娟, 张亚丽, 兴伟, 等. circ_0044556 靶向调控 miR-338-3p/BRD4 轴对三阴性乳腺癌细胞恶性生物学行为的调节作用及其分子机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(9): 1146-1153.

[收稿日期] 2024-05-31 [录用日期] 2024-11-12 [上线日期] 2025-05-27

[摘要] **目的** 探讨 circ_0044556 靶向调控 miR-338-3p/溴结构域蛋白 4(BRD4)轴对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞恶性生物学行为的调节作用及其分子机制。**方法** 采用 TargetScan 在线网站预测 circ_0044556 与 miR-338-3p、miR-338-3p 与 BRD4 的结合位点。双荧光素酶报告基因实验测定 MDA-MB-231 细胞中 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4 的关系。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、Western blotting 检测人 TNBC 细胞系 MDA-MB-231、人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4 蛋白的表达情况。将 MDA-MB-231 细胞分为 NC 组、si-NC 组(转染 si-NC)、si-circ_0044556 组(转染 si-circ_0044556)、si-circ_0044556+inhibitor NC 组(转染 si-circ_0044556 和 inhibitor NC)及 si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor 组(转染 si-circ_0044556 和 miR-338-3p inhibitor), 采用 qRT-PCR 检测 circ_0044556、miR-338-3p 的表达, Western blotting 检测 BRD4、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白的表达, CCK-8 法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Transwell 实验检测细胞侵袭、迁移能力。将 30 只裸鼠随机分为 NC 组(尾静脉注射生理盐水)、si-NC 组(尾静脉注射 LV-NC)、si-circ_0044556 组(尾静脉注射 LV-circ_0044556)、si-circ_0044556+inhibitor NC 组(尾静脉注射 LV-circ_0044556 和 antiagomir NC)及 si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor 组(尾静脉注射 LV-circ_0044556 和 antiagomir miR-338-3p), 每组 6 只。裸鼠皮下注射 MDA-MB-231 细胞构建异种移植瘤模型, 测定肿瘤体积和质量。**结果** TargetScan 预测结果显示, circ_0044556 的下游 miRNA 为 miR-338-3p, miR-338-3p 下游的靶基因可能是 BRD4。与转染 mimic NC 比较, 转染 miR-338-3p mimic 后 MDA-MB-231 细胞中 WT-circ_0044556 荧光素酶活性(0.34±0.03 vs. 1.00±0.15, $P<0.05$)、WT-BRD4 荧光素酶活性(0.41±0.05 vs. 1.05±0.13, $P<0.05$)明显降低。与 MCF-10A 细胞比较, MDA-MB-231 细胞中 circ_0044556、BRD4 蛋白表达水平明显增高, miR-338-3p 表达水平明显降低($P<0.05$)。与 NC 组、si-NC 组比较, si-circ_0044556 组、si-circ_0044556+inhibitor NC 组 MDA-MB-231 细胞中 circ_0044556 表达水平, BRD4、N-cadherin、波形蛋白表达水平, 以及 OD₄₅₀ 值明显降低($P<0.05$), 迁移、侵袭细胞数明显减少($P<0.05$), miR-338-3p 表达水平、E-cadherin 蛋白表达水平升高, 细胞凋亡率明显增高($P<0.05$); 而 miR-338-3p 下调挽救了 circ_0044556 敲低对 MDA-MB-231 细胞侵袭、迁移和增殖的阻滞作用。与 NC 组、si-NC 组比较, si-circ_0044556 组、si-circ_0044556+inhibitor NC 组小鼠肿瘤体积明显减小, 肿瘤质量明显降低($P<0.05$); 与 si-circ_0044556 组、si-circ_0044556+inhibitor NC 组比较, si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor 组肿瘤体积明显增大, 肿瘤质量明显增高($P<0.05$)。**结论** circ_0044556 可能通过 miR-338-3p/BRD4 轴促进 TNBC 细胞恶性生物学行为的发生。

[关键词] circ_0044556; miR-338-3p; 溴结构域蛋白 4; 三阴性乳腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭

Regulatory effect and molecular mechanism of circ_0044556 targeting the miR-338-3p/BRD4 axis on the malignant biological behavior of triple negative breast cancer cells

Dong Xing-Juan, Zhang Ya-Li, Xing Wei, Zhu Ying-Ying, Cheng Yong-Li, Yu Ping*

Department of General Surgery, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2018052)

[作者简介] 董兴娟, 主要从事乳腺癌治疗方面的研究

[通信作者] 于萍, E-mail: 15830971836@163.com

*Corresponding author, E-mail: 15830971836@163.com

This work was supported by the Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Scientific Research Program (2018052)

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect and molecular mechanism of circ_0044556 on the malignant biological behavior of triple negative breast cancer (TNBC) cells by targeting the miR-338-3p/bromodomain-containing protein 4 (BRD4) axis. **Methods** The TargetScan online website was used to predict the binding sites of circ_0044556 with miR-338-3p and miR-338-3p with BRD4. Dual-luciferase reporter gene assays were performed to determine the relationship among circ_0044556, miR-338-3p, and BRD4 in MDA-MB-231 cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were employed to detect the expression of circ_0044556, miR-338-3p, and BRD4 protein in human TNBC cell line MDA-MB-231 and human normal breast epithelial cells MCF-10A. MDA-MB-231 cells were divided into NC group, si-NC group (transfected with si-NC), si-circ_0044556 group (transfected with si-circ_0044556), si-circ_0044556+inhibitor NC group (transfected with si-circ_0044556 and inhibitor NC), and si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor group (transfected with si-circ_0044556 and miR-338-3p inhibitor). qRT-PCR was applied to detect the expression of circ_0044556 and miR-338-3p; Western blotting was used to detect the expression of BRD4, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin; the CCK-8 assay was applied to detect cell proliferation; flow cytometry was applied to detect cell apoptosis; and Transwell assays were used to detect cell invasion and migration. Thirty nude mice were randomly divided into NC group (tail vein injection of normal saline), si-NC group (tail vein injection of LV-NC), si-circ_0044556 group (tail vein injection of LV-circ_0044556), si-circ_0044556+inhibitor NC group (tail vein injection of LV-circ_0044556 and antiagomir NC), and si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor group (tail vein injection of LV-circ_0044556 and antiagomir miR-338-3p), with 6 mice per group. A xenograft tumor model was constructed by subcutaneous injection of MDA-MB-231 cells into nude mice, and tumor volume and weight were measured. **Results** TargetScan prediction results showed that the downstream miRNA of circ_0044556 was miR-338-3p, and the downstream target gene of miR-338-3p might be BRD4. Compared with transfecting mimic NC, transfection with miR-338-3p mimic significantly reduced the luciferase activities of WT-circ_0044556 (0.34 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.15 , $P<0.05$) and WT-BRD4 (0.41 ± 0.05 vs. 1.05 ± 0.13 , $P<0.05$) in MDA-MB-231 cells. Compared with MCF-10A cells, the expression levels of circ_0044556 and BRD4 protein in MDA-MB-231 cells were significantly increased, while the expression level of miR-338-3p was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with NC group and si-NC group, the expression levels of circ_0044556, the protein expression levels of BRD4, N-cadherin, and Vimentin, and the OD_{450} value in MDA-MB-231 cells of si-circ_0044556 group and si-circ_0044556+inhibitor NC group were significantly decreased ($P<0.05$), the number of migrated and invaded cells was significantly reduced ($P<0.05$), and the expression level of miR-338-3p, the protein expression level of E-cadherin, and the cell apoptosis rate in MDA-MB-231 cells were significantly increased ($P<0.05$); downregulation of miR-338-3p rescued the inhibitory effect of circ_0044556 knockdown on invasion, migration, and proliferation of MDA-MB-231 cells. Compared with NC group and si-NC group, the tumor volume and weight in si-circ_0044556 group and si-circ_0044556+inhibitor NC group were significantly decreased ($P<0.05$); compared with si-circ_0044556 group and si-circ_0044556+inhibitor NC group, the tumor volume and weight in si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor group were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** circ_0044556 may promote the malignant biological behaviors of TNBC cells through the miR-338-3p/BRD4 axis.

[Key words] circ_0044556; miR-338-3p; bromodomain-containing protein 4; triple negative breast cancer; proliferation; migration; invasion

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 的特征为缺乏雌激素受体、孕激素受体和酪氨酸激酶受体 2 (Erb-B2 受体), 是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1-3]。尽管 TNBC 的治疗取得了显著进展, 但由于内分泌治疗和靶向治疗的效率低下, TNBC 患者的预后较差^[4-5]。由于 TNBC 易转移, 故深入研究其发病机制并探寻可用的治疗靶点, 对于 TNBC 患者的治疗极其重要^[6]。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 具有闭环分子结构, 表达稳定^[7]。既往研究表明, circRNA 广泛存在于人体中, 可作为竞争性内源性 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 参与、调节可变剪切、转录以及翻译蛋白

质, 从而控制正常生理活动和肿瘤发展^[8]。据报道, circ_0044556 与结直肠癌、胃癌、肝癌等肿瘤进展密切相关^[9-11]。近期 Chen 等^[12]发现, circ_0044556 在 TNBC 组织中高表达, 其过表达可降低 TNBC 细胞对阿霉素的敏感性, 影响 TNBC 的治疗效果, 但其在 TNBC 进展中的作用及其机制尚不清楚。与 circRNA 不同, miRNA 以线性结构形式存在, 具有 5'帽和 3'-poly(A)尾巴, 而 circRNA 可能通过海绵 miRNA 调节癌症相关基因的表达^[13]。miR-338-3p 在乳腺癌中低表达, 上调 miR-338-3p 可抑制乳腺癌细胞的生长、迁移、侵袭和上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[14]。溴结构域蛋白 4 (bromodomain-

containing protein 4, BRD4)在乳腺癌中高表达,与乳腺癌的化疗效果有关,下调BRD4可对乳腺癌起到治疗作用^[15]。另外,在多发性骨髓瘤细胞中,miR-338-3p可靶向调节BRD4的表达^[16],但这一靶向关系尚未在TNBC细胞中得到证实。本研究旨在探究circ_0044556通过调控miR-338-3p/BRD4轴对TNBC细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制,以期对TNBC进展的病理生理机制研究提供新的视野,并为TNBC的靶向治疗提供新的理论依据。

1 材料与与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器 人正常乳腺上皮细胞MCF-10A、TNBC细胞系MDA-MB-231、Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(武汉普诺赛生命科技有限公司); si-circ_0044556、si-NC、miR-338-3p inhibitor、inhibitor NC、Trizol(上海生工生物工程有限公司); pmir-GLO载体(北京天恩泽基因科技有限公司); CCK-8细胞增殖试剂盒(无锡菩禾生物技术有限公司); PrimeScript RT试剂盒(日本TaKaRa公司); microRNA反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 兔源GAPDH、BRD4、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(英国Abcam公司)。实时荧光PCR系统(北京博为高科生物科技有限公司)。

1.2 双荧光素酶报告基因实验测定 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4的关系 使用TargetScan在线网站预测circ_0044556与miR-338-3p、miR-338-3p与BRD4的结合位点。为了验证circ_0044556与miR-338-3p之间的相互作用,将circ_0044556野生型(WT)或突变型(MUT)序列扩增并插入到pmir-GLO载体中。然后将含有circ_0044556-WT/MUT或miR-338-3p mimic/mimic NC的载体共转染到生长良好的MDA-MB-231细胞中,2 d后检测荧光素酶活性。为了验证miR-338-3p与BRD4之间的相互作用,以相同的方式检测BRD4 3'UTR WT和MUT的荧光素酶活性。

1.3 细胞培养及分组 (1)MCF-10A、MDA-MB-231细胞在含1%青霉素-链霉素和10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中置于37℃、5%CO₂条件下培养。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测circ_0044556、miR-338-3p表达水平,Western blotting检测BRD4蛋白的表达。(2)取MDA-MB-231细胞,设置NC组、si-NC组(转染si-NC)、si-circ_0044556组(转染si-circ_0044556)、si-circ_0044556+inhibitor NC组(转染si-circ_0044556和inhibitor NC)、si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组(转染si-circ_0044556和miR-338-3p

inhibitor),除NC组外均转染对应质粒,在37℃、5%CO₂条件下共转染48 h。采用qRT-PCR检测circ_0044556、miR-338-3p表达水平,Western blotting检测BRD4、E-cadherin、波形蛋白、N-cadherin蛋白的表达,CCK-8法检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,Transwell实验检测细胞侵袭和迁移能力。

1.3.1 qRT-PCR检测 circ_0044556、miR-338-3p表达水平 使用Trizol提取细胞总RNA,PrimeScript RT试剂盒合成第一链cDNA,microRNA反转录试剂盒进行miRNA的反转录。完成总RNA和miRNA的反转录后,使用SYBR Green PCR预混液在实时荧光PCR系统中进行qRT-PCR。采用2^{-ΔΔCt}法计算circ_0044556、miR-338-3p表达水平,归一化为U6或GAPDH。引物序列:miR-338-3p正向5'-AACCGGTC CAGCATCAGTGATT-3',反向5'-CAGTGCAGGGTC CGAGGT-3'; circ_0044556正向5'-TGACGAGAGAAC TGCC-3',反向5'-GCACCATTACACGAGC-3'; U6正向5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'; GAPDH正向5'-GGAGAGTGTTCCTCGTCCC-3',反向5'-T TACTCCTTGAGGCCATGTAG-3'。

1.3.2 Western blotting检测 BRD4、E-cadherin、波形蛋白、N-cadherin蛋白的表达 用RIPA缓冲液提取细胞总蛋白,经BCA法定量后,行凝胶电泳分离,并转移到PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭30 min后,加入稀释后的兔源GAPDH(1:2000)、BRD4(1:1000)、E-cadherin(1:2000)、波形蛋白(1:2000)、N-cadherin(1:2000)一抗4℃孵育过夜,次日加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(1:5000)室温孵育2 h,ECL试剂曝光。利用凝胶成像仪检测,ImageJ软件对蛋白进行定量。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖情况 取各组细胞,以1×10⁴个/孔的密度接种在96孔板中,培养过夜。然后加入CCK-8试剂培养2 h。采用酶标仪测定450 nm处的吸光度(OD₄₅₀)值。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取各组细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,PBS洗涤2次。将细胞浓度调至1×10⁶个/ml。根据Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒制造商的染色方案与Annexin V-FITC和PI孵育。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.5 Transwell实验检测细胞侵袭和迁移能力 Transwell悬挂细胞培养插入物涂有基质胶。将各组细胞用无血清培养24 h后,重悬,将200 μl细胞悬液(3×10⁴个/ml)接种于预包被的插入物中,并在24孔板中添加0.75 ml培养基(每孔含10% FBS)孵育

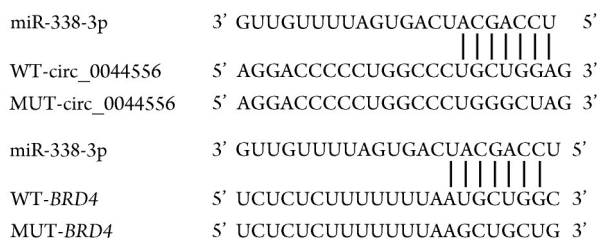
48 h。用4%多聚甲醛溶液固定细胞，并用结晶紫染色液染色。利用显微镜计数每个视野中浸润的细胞数。迁移实验步骤同侵袭实验，但腔室未预涂基质胶。

1.4 小鼠异种移植瘤实验 本研究获河北省中医院动物伦理委员会批准(202301006)。30只5周龄BALB/c小鼠购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场[实验动物许可证号：SCXK(豫)2019-0002]。小鼠随机分为NC组、si-NC组、si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组、si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组，每组6只。各组小鼠均采用裸鼠右侧腋窝皮下接种MDA-MB-231细胞(3×10^5 个/ml)的方法建立异种移植瘤模型。造模后，si-NC组、si-circ_0044556组分别尾静脉注射LV-NC、LV-circ_0044556，si-circ_0044556+inhibitor NC组同时尾静脉注射LV-circ_0044556和antiagomir NC，si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组同时尾静脉注射LV-circ_0044556+antiagomir miR-338-3p，NC组尾静脉注射生理盐水，5周后处死小鼠，测量肿瘤质量及体积。

1.5 统计学处理 采用SPSS 25.0软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布，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，进一步两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4在MDA-MB-231细胞中的关系 TargetScan预测结果显示，circ_0044556的下游miRNA为miR-338-3p，miR-338-3p下游的靶基因可能是BRD4(图1)。与转染mimic NC比较，转染miR-338-3p mimic后MDA-MB-231细胞中WT-circ_0044556荧光素酶活性明显降低(0.34 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.15 , $P < 0.05$)，而MUT-circ_0044556荧光素酶活性差异无统计学意义(1.05 ± 0.12 vs. 1.03 ± 0.14 , $P > 0.05$)。与转染mimic NC比较，转染miR-338-3p mimic后MDA-MB-231细胞中WT-BRD4荧光素酶活性明显降低(0.41 ± 0.05 vs. 1.05 ± 0.13 , $P < 0.05$)，MUT-



BRD4.溴结构域蛋白4；WT.野生型；MUT.突变型

图1 miR-338-3p与circ_0044556或BRD4的潜在结合位点
Fig.1 Potential binding sites of miR-338-3p to circ_0044556 or BRD4

BRD4荧光素酶活性差异无统计学意义(1.07 ± 0.11 vs. 1.05 ± 0.10 , $P > 0.05$)。

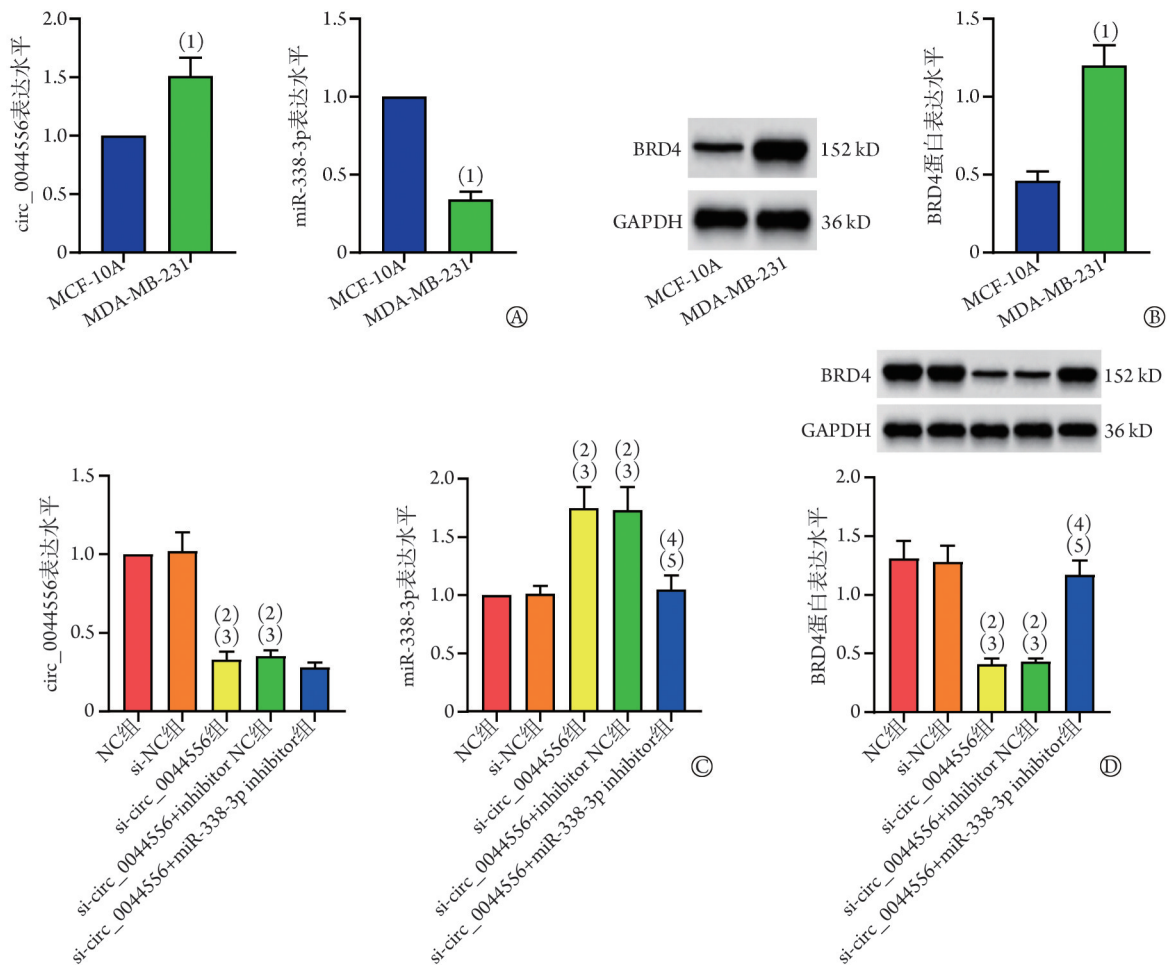
2.2 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4蛋白在TNBC细胞中的表达情况 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示，与MCF-10A细胞比较，MDA-MB-231细胞中circ_0044556、BRD4蛋白表达水平明显升高，miR-338-3p表达水平明显降低($P < 0.05$ ，图2A、B)。

2.3 circ_0044556、miR-338-3p、BRD4蛋白在MDA-MB-231细胞中的表达情况 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示，与NC组、si-NC组比较，si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组circ_0044556、BRD4蛋白表达水平明显降低，miR-338-3p表达水平明显升高($P < 0.05$)；与si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组比较，si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组BRD4蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)，miR-338-3p表达水平明显降低($P < 0.05$)，但circ_0044556表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$ ，图2C、D)。

2.4 circ_0044556、miR-338-3p对MDA-MB-231细胞增殖的影响 CCK-8法检测结果显示，NC组、si-NC组、si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组、si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组OD₄₅₀值依次为 0.97 ± 0.12 、 0.96 ± 0.13 、 0.35 ± 0.03 、 0.33 ± 0.04 、 0.88 ± 0.09 。与NC组、si-NC组比较，si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组OD₄₅₀值明显降低($P < 0.05$)；与si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组比较，si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组OD₄₅₀值明显增高($P < 0.05$)。

2.5 circ_0044556、miR-338-3p对MDA-MB-231细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示，NC组、si-NC组、si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组、si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组细胞凋亡率依次为 $5.47\% \pm 0.61\%$ 、 $5.68\% \pm 0.65\%$ 、 $24.41\% \pm 3.16\%$ 、 $25.28\% \pm 3.36\%$ 、 $10.27\% \pm 0.99\%$ 。与NC组、si-NC组比较，si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$)；与si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组比较，si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$ ，图3)。

2.6 circ_0044556、miR-338-3p对MDA-MB-231细胞迁移、侵袭及EMT相关蛋白表达的影响 Transwell实验和Western blotting检测结果显示，与NC组、si-NC组比较，si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组侵袭、迁移细胞数明显减少，E-cadherin蛋白表达水平明显升高，N-cadherin、波形蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)；与si-circ_0044556组、si-circ_0044556+inhibitor NC组比较，si-circ_



MCF-10A. 人正常乳腺上皮细胞; BRD4. 溴结构域蛋白4; A. 不同细胞中 circ_0044556、miR-338-3p 表达水平比较; B. 不同细胞中 BRD4 蛋白表达水平比较; C. 各组 MDA-MB-231 细胞中 circ_0044556、miR-338-3p 表达水平比较; D. 各组 MDA-MB-231 细胞中 BRD4 蛋白表达水平比较; 与 MCF-10A 细胞比较, (1) $P < 0.05$; 与 NC 组比较, (2) $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, (3) $P < 0.05$; 与 si-circ_0044556 组比较, (4) $P < 0.05$; 与 si-circ_0044556+inhibitor NC 组比较, (5) $P < 0.05$

图2 各组 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌细胞中 circ_0044556、miR-338-3p 及 BRD4 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of circ_0044556, miR-338-3p, and BRD4 protein in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells of each group

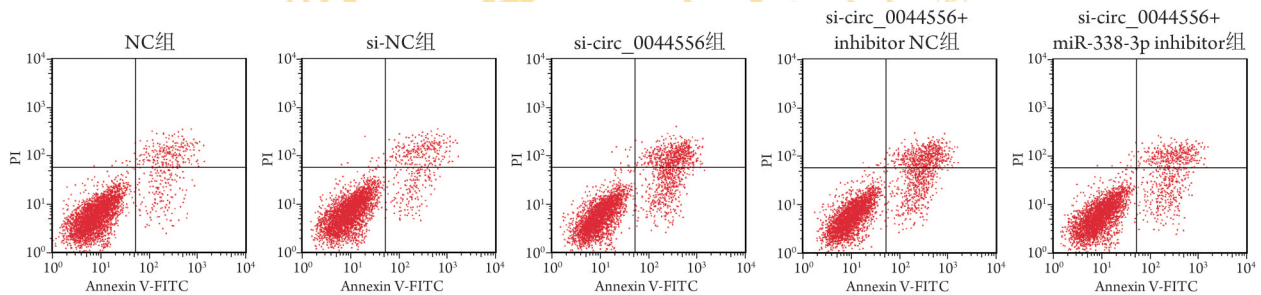


图3 流式细胞术检测各组 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌细胞凋亡情况

Fig.3 Apoptosis of MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells in each groups was detected by flow cytometry

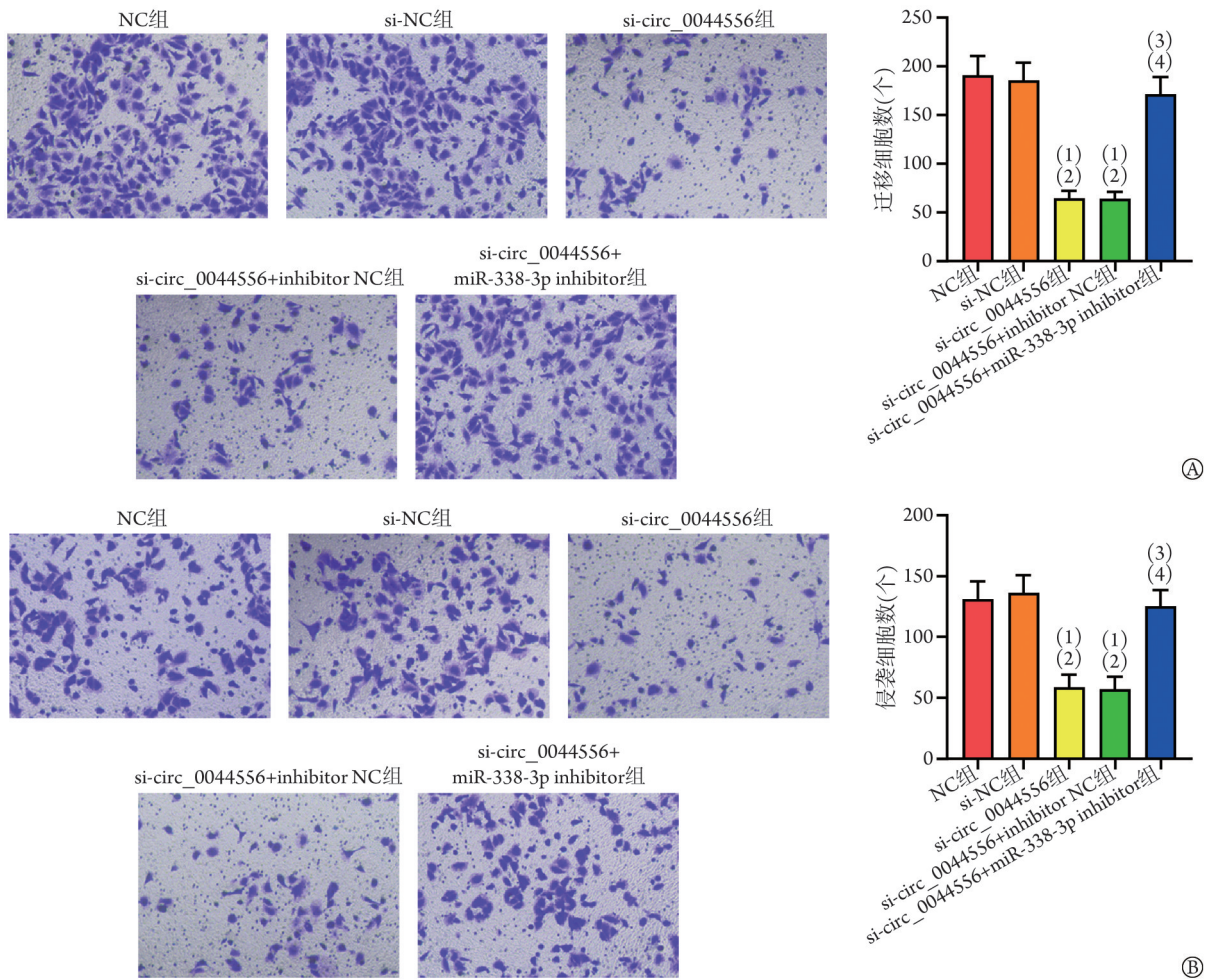
0044556+miR-338-3p inhibitor 组侵袭、迁移细胞数明显增多, E-cadherin 蛋白表达水平明显降低, N-cadherin、波形蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$, 图4、5)。

2.7 Circ_0044556、miR-338-3p 对移植瘤小鼠肿瘤体积和质量的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-circ_0044556 组、si-circ_0044556+inhibitor NC 组肿瘤体积明显减小, 肿瘤质量明显降低($P < 0.05$); 与 si-circ_

0044556 组、si-circ_0044556+inhibitor NC 组比较, si-circ_0044556+miR-338-3p inhibitor 组肿瘤体积明显增大, 肿瘤质量明显增高($P < 0.05$, 图6)。

3 讨论

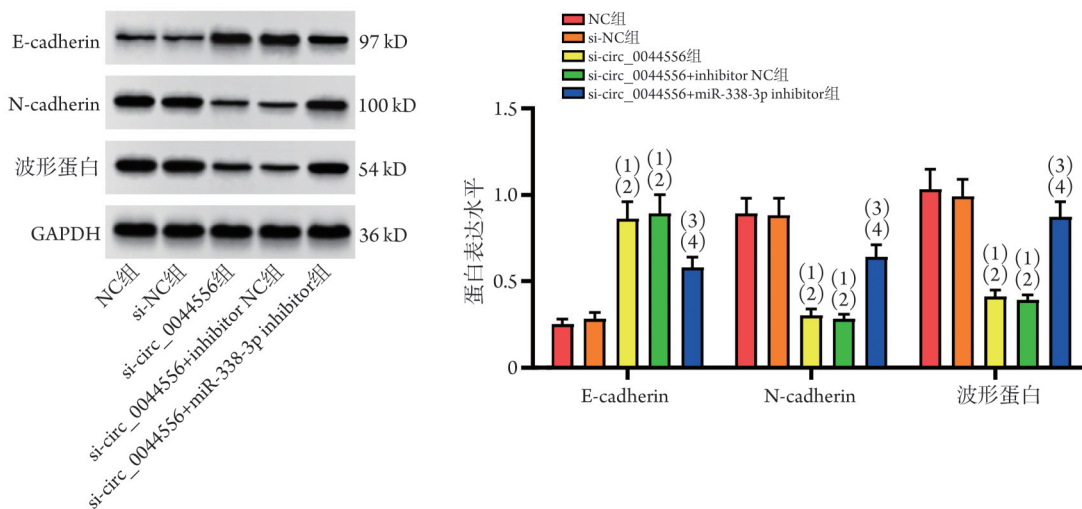
TNBC 是一种侵袭性乳腺癌, 目前缺乏有效的治疗方法。确定 TNBC 进展的关键调节因子对于开发新



A. 各组MDA-MB-231细胞迁移细胞数比较; B. 各组MDA-MB-231细胞中侵袭细胞数比较; 与NC组比较, (1) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-circ_0044556组比较, (3) $P < 0.05$; 与si-circ_0044556+inhibitor NC组比较, (4) $P < 0.05$

图4 Transwell实验检测各组MDA-MB-231三阴性乳腺癌细胞迁移、侵袭情况

Fig.4 Migration and invasion of MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells in each group detected by Transwell experiment



与NC组比较, (1) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-circ_0044556组比较, (3) $P < 0.05$; 与si-circ_0044556+inhibitor NC组比较, (4) $P < 0.05$

图5 Western blotting检测各组MDA-MB-231三阴性乳腺癌细胞中EMT相关蛋白的表达情况

Fig.5 Expression of EMT-related proteins in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells in each groups was detected by Western blotting

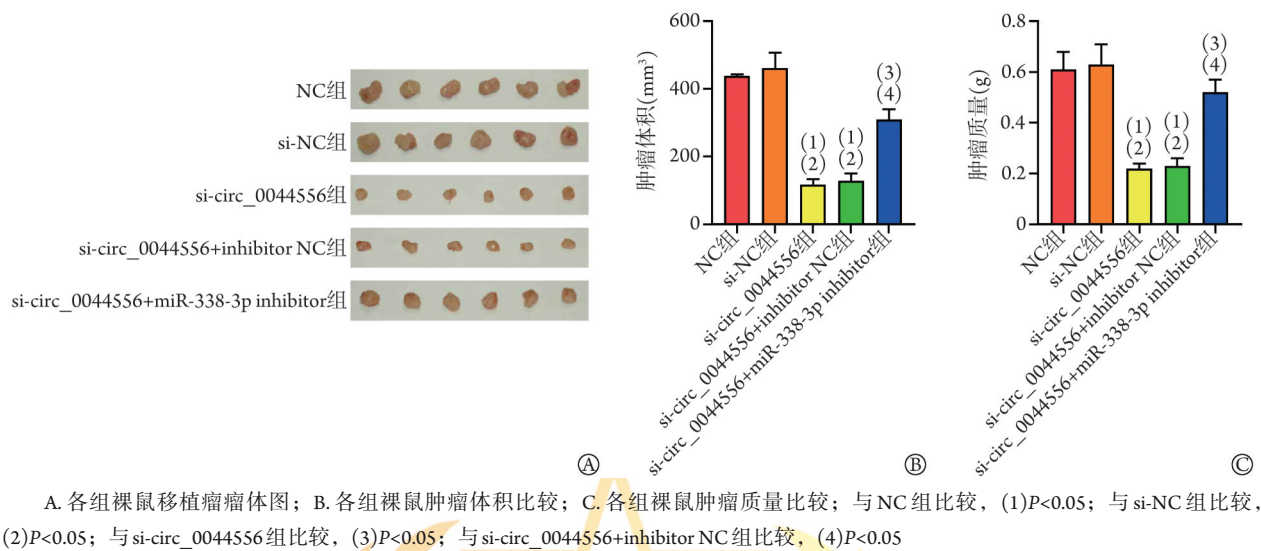


图6 敲低 circ_0044556 对裸鼠肿瘤质量和体积的影响

Fig.6 Effects of circ_0044556 knockdown on tumor volume and tumor mass of nude mice

的抗癌策略非常重要^[17]。已有研究发现多个 circRNAs 可调节 TNBC 的生长和转移^[18]。如 Wang 等^[19]发现, circWAC 下调可增加 TNBC 细胞在体外和体内对紫杉醇的敏感性。Zeng 等^[20]发现, circANKS1B 在体外和体内可促进 EMT, 加快乳腺癌转移。近期 Chen 等^[12]发现, circ_0044556 在 TNBC 中高表达, 其过表达可促进细胞活力、阿霉素抗性和迁移。与该研究结果一致的是, 本研究也发现 MDA-MB-231 细胞中 circ_0044556 表达上调, circ_0044556 敲低后 MDA-MB-231 细胞 OD₄₅₀ 值下降、凋亡率增高, 表明 circ_0044556 能够抑制 MDA-MB-231 细胞凋亡, 促进其增殖; 但与其不同的是, 本研究通过异种移植实验发现 circ_0044556 敲低可缩小移植瘤小鼠的肿瘤体积, 降低其肿瘤质量, 从体内、体外证实了敲低 circ_0044556 对 MDA-MB-231 细胞生长具有抑制作用, 提示 circ_0044556 在 TNBC 中发挥促癌作用。

恶性肿瘤最致命和关键的特征之一是转移, EMT 在肿瘤转移中发挥着促进作用^[21]。在 EMT 的过程中, 上皮细胞失去其细胞极性和细胞间黏附, 获得侵袭性和迁移性^[22]。研究发现, 上调 N-cadherin、波形蛋白, 下调 E-cadherin 可使上皮细胞获得间质表型而促进 EMT 进程^[23]。本研究发现, 下调 circ_0044556 可通过缓解 EMT 进程抑制 TNBC 转移的发生。

miR-338-3p 被确定为 circ_0044556 的下游靶 miRNA。miR-338-3p 过表达可加速乳腺癌细胞凋亡, 抑制乳腺癌细胞的侵袭和增殖^[24]。本研究发现, MDA-MB-231 细胞中 miR-338-3p 表达下调, 敲低 miR-338-3p 恢复了 circ_0044556 沉默对 MDA-MB-231 细胞恶性行为的抑制作用, 提示 circ_0044556 可能通过

miR-338-3p 在 MDA-MB-231 细胞中发挥促癌作用。本研究还发现, MDA-MB-231 细胞中 BRD4 高表达, 与 miR-338-3p 的表达相反, 双荧光素酶报告基因实验证实 BRD4 被 miR-338-3p 负调控, 且该靶向作用与其在多发性骨髓瘤中的作用^[16]一致, 推测 miR-338-3p 可能通过靶向下调 BRD4 来抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程。研究显示, BRD4 在胃癌组织中明显上调^[25], 并通过 Sonic hedgehog 信号通路促进膀胱癌细胞的迁移和侵袭, 增加顺铂耐药性^[26]; 下调 BRD4 能够抑制乳腺癌细胞的生长和迁移^[27]。本研究结果显示, 敲低 circ_0044556 下调了 BRD4 蛋白的表达, 而抑制 miR-338-3p 后 BRD4 蛋白表达水平升高, 提示 circ_0044556 对 MDA-MB-231 细胞进展和转移的促进作用依赖于 miR-338-3p/BRD4 轴。

综上所述, 本研究证实 circ_0044556/miR-338-3p/BRD4 轴与 TNBC 进展有关, 敲低 circ_0044556 可能通过靶向上调 miR-338-3p、下调 BRD4 抑制 TNBC 细胞的生长、迁移和侵袭, 并诱导其凋亡。circ_0044556/miR-338-3p/BRD4 轴可能是 TNBC 的潜在靶点。

但本研究尚存在一定局限性: 首先, 尽管在 MDA-MB-231 细胞中已对相关机制进行了研究确认, 但在其他细胞系中的普遍性仍需进一步探究; 其次, miR-338-3p/BRD4 在 MDA-MB-231 细胞中的靶向作用尚未通过回复实验证实, 因此需要进一步研究来确定 miR-338-3p/BRD4 在 TNBC 进展中的调控机制。未来的研究还需持续开展动物研究、临床试验对 circ_0044556 的抗 TNBC 作用进行确认。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] 黄佳旭, 黄锴源, 孙何兴, 等. 三阴性乳腺癌新辅助化疗疗效预测研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(6): 729-734.
- [3] Li YQ, Sun FZ, Li CX, et al. RARRES2 regulates lipid metabolic reprogramming to mediate the development of brain metastasis in triple negative breast cancer[J]. *Mil Med Res*, 2024, 11(1): 34-49.
- [4] Macdonald I, Nixon NA, Khan OF. Triple-negative breast cancer: a review of current curative intent therapies[J]. *Curr Oncol*, 2022, 29(7): 4768-4778.
- [5] 朱紫嘉, 陈霞, 崔曼, 等. 基于红景天苷对三阴性乳腺癌关键差异基因作用机制的生物信息学和分子对接技术分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(3): 759-769.
- [6] Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176-198.
- [7] Li Z, Chen Z, Hu G, et al. Roles of circular RNA in breast cancer: present and future[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 3945-3954.
- [8] Jahani S, Nazeri E, Majidzadeh-A K, et al. Circular RNA? A new biomarker for breast cancer: a systematic review[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7-8): 5501-5510.
- [9] Jing L, Wu J, Tang X, et al. Identification of circular RNA hsa_circ_0044556 and its effect on the progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 427-438.
- [10] Ma Y, Ren Y, Wen H, et al. CircCOL1A1 promotes the progression of gastric cancer cells through sponging mir-145 to enhance RABL3 expression[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 6724854.
- [11] 郑文, 李萌, 张艳丽, 等. Hsa_circ_0044556通过MIR145/PD-L1介导NK细胞对肝癌细胞的杀伤作用[J]. *河北医学*, 2022, 28(9): 1409-1414.
- [12] Chen J, Shi P, Zhang J, et al. CircRNA_0044556 diminishes the sensitivity of triple-negative breast cancer cells to adriamycin by sponging miR-145 and regulating NRAS[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(2): 51-68.
- [13] Luan X, Wang Y. LncRNA XLOC_006390 facilitates cervical cancer tumorigenesis and metastasis as a ceRNA against miR-331-3p and miR-338-3p[J]. *J Gynecol Oncol*, 2018, 29(6): e95.
- [14] He J, Wang J, Li S, et al. Hypoxia-inhibited miR-338-3p suppresses breast cancer progression by directly targeting ZEB2[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10): 3550-3563.
- [15] Liu B, Liu X, Han L, et al. BRD4-directed super-enhancer organization of transcription repression programs links to chemotherapeutic efficacy in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(6): e2109133119.
- [16] Wang Y, Lin Q, Song C, et al. Circ_0007841 promotes the progression of multiple myeloma through targeting miR-338-3p/BRD4 signaling cascade[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 383.
- [17] Ma JY, Liu SH, Chen J, et al. Metabolism-related long non-coding RNAs (lncRNAs) as potential biomarkers for predicting risk of recurrence in breast cancer patients[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3726-3736.
- [18] Zheng X, Huang M, Xing L, et al. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 73-87.
- [19] Wang L, Zhou Y, Jiang L, et al. CircWAC induces chemotherapeutic resistance in triple-negative breast cancer by targeting miR-142, upregulating WWP1 and activating the PI3K/Akt pathway[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 43-59.
- [20] Zeng K, He B, Yang BB, et al. The pro-metastasis effect of circANKS1B in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 160-175.
- [21] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-776.
- [22] Mohamed H, Haglund C, Jouhi L, et al. Expression and role of E-cadherin, β -catenin, and vimentin in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Histochem Cytochem*, 2020, 68(9): 595-606.
- [23] Jiang Y, Cao W, Wu K, et al. LncRNA LINC00460 promotes EMT in head and neck squamous cell carcinoma by facilitating peroxiredoxin-1 into the nucleus[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 365.
- [24] Ahmadpour Youshanlui M, Yari A, Bahojb Mahdavi SZ, et al. BRD4 expression and its regulatory interaction with miR-26a-3p, DLGS-AS1, and JMJD1C-AS1 lncRNAs in gastric cancer progression[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 356.
- [25] Liu T, Zhang Z, Wang C, et al. BRD4 promotes the migration and invasion of bladder cancer cells through the sonic hedgehog signaling pathway and enhances cisplatin resistance[J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(2): 179-187.
- [26] Wan L, Han Q, Zhu B, et al. Circ-TFF1 facilitates breast cancer development via regulation of miR-338-3p/FGFR1 axis[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(1): 315-335.
- [27] 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.

(责任编辑: 纪方方)