

Hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 轴调控乳腺癌进展的研究

薛迪新 吴伟力 陈积贤 梁美珍 陈澄亮 贺新伟 余铭 林道浙

【摘要】目的 探讨环状 RNA hsa_circ_0001946 在乳腺癌组织中的表达情况及 hsa_circ_0001946/miR-7/Kruppel 样因子 4 (KLF4) 轴调控乳腺癌细胞发生侵袭和转移的机制。**方法** 收集 2018 年 6 月至 2019 年 8 月在温州医科大学附属第三医院切除的乳腺癌组织标本及其癌旁正常乳腺组织标本 91 例。采用实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌及其癌旁正常组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 mRNA 表达情况及乳腺癌细胞株 MCF-7 中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin) mRNA 表达情况; 采用细胞侵袭实验分析乳腺癌 MCF-7 细胞株的侵袭能力; 采用 Western blot 法检测乳腺癌细胞株 MCF-7 中 E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白表达情况。**结果** 与癌旁正常乳腺组织比较, 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 和 KLF4 mRNA 表达水平均升高, miR-7 表达水平下降 (均 $P < 0.05$)。与正常乳腺组织、乳腺导管原位癌组织比较, 乳腺浸润性导管癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平升高 (均 $P < 0.05$)。分析 82 例乳腺浸润性导管癌患者发现, 有淋巴结转移者 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$)。Pearson 相关显示, 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 的表达与 miR-7 的表达呈负相关 ($r = -0.418, P < 0.05$), miR-7 的表达与 KLF4 mRNA 的表达呈负相关 ($r = -0.340, P < 0.05$)。与阴性对照组相比, 转染 sh-hsa_circ_0001946 组 MCF-7 细胞中 miR-7 表达升高, KLF4 mRNA 表达下降 (均 $P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 转染 miR-7 mimics 组 MCF-7 细胞中 KLF4 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 转染 sh-hsa_circ_0001946 组侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 转染 KLF4 siRNA 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin mRNA 及蛋白表达水平均升高, N-cadherin mRNA 及蛋白表达水平均下降 (均 $P < 0.05$)。**结论** Hsa_circ_0001946 在乳腺癌细胞中表达升高, 可通过 miR-7/KLF4 调控轴使癌细胞发生上皮-间质转化, 促进癌细胞的侵袭和转移。

【关键词】 乳腺癌 环状 RNA 上皮间质转化 侵袭

Circular RNA hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 axis promotes progression of breast cancer XUE Dixin, WU Weili, CHEN Jixian, LIANG Meizhen, CHEN Chengliang, HE Xinwei, YU Ming, LIN Daozhe. Department of Thyroid and Breast Surgery, Ruian People's Hospital (the Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University), Ruian 325200, China
Corresponding author: WU Weili, E-mail: weili5566@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of circular RNA hsa_circ_0001946 in breast cancer and the molecular mechanisms of hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 axis in regulating cancer progress. **Methods** Ninety-one cases of breast cancer tissues and its adjacent normal breast tissues were collected from the Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University from June 2018 to August 2019. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of circRNA hsa_circ_0001946, miR-7 and KLF4 in breast cancer and its adjacent normal tissues. The expressions of hsa_circ_0001946, miR-7, KLF4 mRNA, E-cadherin mRNA and N-cadherin mRNA in breast cancer MCF-7 cells were detected by fluorescence quantitative PCR. Transwell invasion assay was used to analyze the invasion and migration ability of MCF-7 cells. The protein expression of E-cadherin and N-cadherin in MCF-7 cells was detected by Western blot. **Results** In 91 cases of breast cancer, the expression of hsa_circ_0001946 increased, the expression of miR-7 decreased, and the expression of KLF4 mRNA increased (all $P < 0.05$). Compared with normal breast tissue and ductal carcinoma in situ, the expression of hsa_circ_0001946 was significantly increased in invasive ductal carcinoma of breast ($P < 0.05$). In 82 cases of invasive ductal carcinoma, the expression of hsa_circ_0001946 was significantly increased in cases with lymph node metastasis compared with

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.23.2021-1912

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2018KY770, 2019KY672)

作者单位: 325200 瑞安市人民医院 (温州医科大学附属第三医院) 甲乳外科

通信作者: 吴伟力, E-mail: weili5566@sina.com.

that without lymph node metastasis ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that the expression of hsa_circ_0001946 was negatively correlated with the expression of miR-7 ($r = -0.418$, $P < 0.05$), and expression of miR-7 was negatively correlated with KLF4 expression ($r = -0.340$, $P < 0.05$). Compared with the negative control group, miR-7 expression was increased and KLF4 mRNA expression was decreased in MCF-7 cells transfected with sh-hsa_circ_0001946 group (both $P < 0.05$). Compared with the negative control group, the expression of KLF4 mRNA was decreased in MCF-7 cells transfected with miR-7 mimics group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the number of invaded cells was significantly decreased in MCF-7 cells transfected with sh-hsa_circ_0001946 group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, E-cadherin mRNA and protein expression were increased and N-cadherin mRNA and protein expression were decreased in MCF-7 cells transfected with KLF4 siRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of hsa_circ_0001946 is increased in breast cancer, it may induce epithelial-mesenchymal transition, and promote the invasion and metastasis of cancer cells through miR-7/KLF4 regulatory axis.

【Key words】 Breast cancer Circular RNA Epithelial-mesenchymal transition Invasion

乳腺癌是我国女性常见的恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率呈明显上升趋势。近年来,新的乳腺癌靶向药物层出不穷,明显改善了早期乳腺癌患者的预后,但是,局部晚期或者有转移的乳腺癌患者预后仍然较差。目前乳腺癌侵袭和转移的分子机制仍旧不明,寻找新的生物靶点对于改善乳腺癌患者的预后意义重大。miR-7 是一种小分子 miRNA,研究显示其在乳腺癌中表达异常,可抑制乳腺癌干细胞发生转移^[1-2];研究还发现另一类非编码环状 RNA (circular RNA, circRNA) 可调控 miRNA 的表达,进而参与肿瘤的侵袭和转移^[3]。为了寻找新的调控 miR-7 的 circRNA,笔者利用 starBase 数据库 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 进行检索,结果显示 hsa_circ_0001946 与 miR-7 的结合位点最多,共有 45 个,因此,笔者预测 hsa_circ_0001946 可调控 miR-7 的表达。进一步检索文献发现,hsa_circ_0001946 表达与非小细胞肺癌的侵袭和转移有关^[4],而在乳腺癌中,hsa_circ_0001946 表达与癌细胞侵袭和转移的机制尚未被阐明。研究显示肿瘤上皮细胞获得侵袭和转移能力往往伴随着上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),还伴随着 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 表达的变化^[5]。因此,本研究探讨 hsa_circ_0001946 表达与乳腺癌细胞侵袭和转移的关系,并阐述癌细胞获得侵袭和转移的能力与 EMT 的关系,为乳腺癌治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 组织标本的收集 收集 2018 年 6 月至 2019 年 8 月在温州医科大学附属第三医院切除的乳腺癌组织标本及其癌旁正常乳腺组织标本 91 例,将标本用液氮速冻,保存在 -80°C 冰箱中。所有患者均为女性,术

前均未进行放化疗,乳腺癌分期根据 2017 年美国癌症联合委员会 (AJCC) 提出的第 8 版分期。其中乳腺导管原位癌 9 例,乳腺浸润性导管癌 82 例。在乳腺浸润性导管癌中,无淋巴结转移 41 例,有淋巴结转移 41 例 (N_1 为 22 例, N_2 为 8 例, N_3 为 11 例)。本研究经医院医学伦理委员会审批通过。

1.2 主要试剂和仪器 乳腺癌细胞株 MCF-7 (中国自北纳生物公司); RPMI1640 细胞培养基 (美国 Gibco 公司); sh-hsa_circ_0001946 及其阴性对照核苷酸、miR-7 mimics 及其阴性对照寡核苷酸、Kruppel 样因子 4 (Kruppel-like factor 4, KLF4) 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 及其阴性对照核苷酸 (中国上海吉玛制药技术有限公司); Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II (日本 TaKaRa 公司); Matrigel (美国 BD Bioscience 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); E-cadherin 及 N-cadherin 一抗 (美国 Abcam 公司); 200 倍显微镜 (日本 Olympus 公司); RT-PCR 仪 (德国 Biometra 公司); 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 细胞转染和分组 乳腺癌细胞株 MCF-7 接种于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。采用 Lipofectamine 2000 进行细胞转染,转染前 1 d 将细胞接种至六孔板内,每孔 1×10^6 个细胞,转染时细胞长至 90% 融合。分别将 Lipofectamine 2000 和核苷酸加入到 250 μl OPTI-MEM 培养基中稀释,将稀释液混合,轻轻混匀,室温静置 20 min,转染 4~6 h 后,细胞换液,转染 24 h 后,收集细胞检测 miR-7、KLF4、E-cadherin、N-cadherin mRNA 表达及 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达。细胞分组: (1) 转染 sh-hsa_circ_0001946 组及阴性对照组: 指转染 sh-

hsa_circ_0001946 的乳腺癌 MCF-7 细胞组及转染阴性对照核苷酸的乳腺癌 MCF-7 细胞组, 此组细胞分别采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-7、KLF4 mRNA 表达水平及采用 Transwell 侵袭实验检测侵袭细胞数。

(2) 转染 miR-7 mimics 组及其阴性对照组: 指转染 miR-7 mimics 的乳腺癌 MCF-7 细胞组及转染阴性对照核苷酸的乳腺癌 MCF-7 细胞组, 此组细胞采用实时荧光定量 PCR 法检测 KLF4 mRNA 的表达水平。

(3) 转染 KLF4 siRNA 组及其阴性对照组: 指转染 KLF4 siRNA 的乳腺癌 MCF-7 细胞组及转染阴性对照核苷酸的乳腺癌 MCF-7 细胞组, 此组细胞分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测 E-cadherin、N-cadherin mRNA 和蛋白表达水平。

1.4 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4、E-cadherin、N-cadherin mRNA 表达水平检测 采用实时荧光定量 PCR 法。总 RNA 提取采用 TRIzol 试剂, 乳腺癌组织用液氮研磨, 细胞直接用 TRIzol 试剂进行裂解, 提取的总 RNA 保存在 4℃ 冰箱供后续的逆转录及实时荧光定量 PCR 使用。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit 进行逆转录, 反应条件如下: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 保存; 实时荧光定量 PCR 采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II, 20 μl 体系参照说明书, 反应条件如下: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 共 40 个循环, 所有实验重复 3 次, 以 β-actin 为内参。RT-PCR 的引物如下: miR-7 茎环引物: 5'-CTCAACTGGTGTCTGCTGGACTCGGCAATTCAGT-TGAGACAACAAAAT-3', 正向引物: 5'-ACACTCCAGC-TGGGTGGAAGACTACTGAT-3', 反向引物: 5'-TGCTGTCGTGGAGTTCG-3'; hsa_circ_0001946 正向引物: 5'-GAAAAATCCACATCTTCCAGACAA-3', 反向引物: 5'-GAAGACATGGATATTGAGCCAGT-3'; KLF4 正向引物: 5'-TTCCCATCTCAAGGCACACC-3', 反向引物: 5'-CATGTGTAAGGCGAGGTGGT-3'; E-cadherin 正向引物: 5'-CCTTCACAGCAGAACTAACA-3', 反向引物: 5'-CGCTTTCAGATTTTCATCAA-3'; N-cadherin 正向引物: 5'-ATTGGACCATCACTCGGCTTA-3', 反向引物: 5'-CACACTGGCAAACCTTCACG-3'; β-actin 正向引物: 5'-TAGTTGCGTTACACCCTTCTTG-3', 反向引物: 5'-TCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 RNA 的相对表达量。

1.5 细胞侵袭能力检测 采用 Transwell 侵袭实验。使用 Matrigel 包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 置 37℃ 30 min 使 Matrigel 聚合成凝胶, 撤血清让细胞饥饿 12 h, 制备细胞悬浊液。取细胞悬液 100 μl 加入

Transwell 小室, 24 孔板下室加入 500 μl 含 10% FBS 的培养基, 培养细胞 24 h, 取出 Transwell 小室, 弃掉孔中培养液, 用无钙的 PBS 洗 2 遍, 甲醛固定 30 min, 将小室适当风干, 在 200 倍显微镜下随机选取 3 个视野对侵袭的细胞进行计数。

1.6 E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白表达水平检测 采用 Western blot 法。使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 收集完蛋白样品后, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白质浓度测定, 用 SDS-PAGE 电泳分离总蛋白, 转染到 PVDF 膜上, 转膜完毕后, 立即把蛋白膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中, 漂洗 1~2 min, 以洗去膜上的转膜液, 加入 Western 封闭液, 在摇床上缓慢摇动, 室温封闭 60 min。然后用 E-cadherin (1:1 000) 及 N-cadherin (1:3 000) 一抗孵育, 4℃ 过夜, 加入洗涤液, 在摇床上缓慢摇动洗涤 5~10 min, 吸尽洗涤液后, 再加入洗涤液, 洗涤 5~10 min, 共洗涤 3 次, 二抗孵育, 显影, 用胶片进行拍照。Western blot 条带的灰度值采用 Image J 软件进行分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织比较采用配对 *t* 检验。采用 Pearson 相关分析乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 mRNA 表达水平的相关性。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 mRNA 表达水平比较 与癌旁正常乳腺组织比较, 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 和 KLF4 mRNA 表达水平均升高, miR-7 表达水平下降, 差异均有统计学意义 (均 P<0.05), 见表 1。

表 1 乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 mRNA 表达水平比较

组织	n	hsa_circ_0001946	miR-7	KLF4
乳腺癌组织	91	1.194 ± 0.616	1.021 ± 0.581	1.300 ± 0.590
癌旁正常乳腺组织	91	0.686 ± 0.458	1.812 ± 1.091	0.922 ± 0.546
<i>t</i> 值		6.911	-6.486	4.256
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: KLF4 为 Kruppel 样因子 4

2.2 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 的表达与乳腺癌浸润和转移的关系 正常乳腺组织、乳腺导管原位癌组织、乳腺浸润性导管癌组织中 hsa_circ_0001946

mRNA 表达水平分别为 0.686 ± 0.458 、 0.628 ± 0.216 、 1.256 ± 0.614 。与正常乳腺组织、乳腺导管原位癌组织比较, 乳腺浸润性导管癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平升高, 差异均有统计学意义 ($t=7.126$ 和 6.348 , 均 $P<0.05$); 而正常乳腺组织和乳腺导管原位癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义 ($t=0.668$, $P>0.05$), 提示 hsa_circ_0001946 表达的升高与乳腺癌细胞的癌变无关, 而与乳腺癌细胞发生浸润有关, 见图 1a。

进一步分析 82 例乳腺浸润性导管癌患者, 结果发现有淋巴结转移者 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平为 1.425 ± 0.732 , 高于无淋巴结转移者的 1.087 ± 0.411 , 差异有统计学意义 ($t=-2.575$, $P<0.05$), 提示 hsa_circ_0001946 表达升高与乳腺癌转移有关, 见图 1b。

2.3 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 mRNA 表达的相关性分析 Pearson 相关显示, 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 的表达与 miR-7 的表达呈负相关 ($r=-0.418$, $P<0.05$), miR-7 的表达与 KLF4

mRNA 的表达呈负相关 ($r=-0.340$, $P<0.05$), 提示在乳腺癌组织中, 存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 的调控轴, 见图 2。

2.4 转染 sh-hsa_circ_0001946 组及其阴性对照组中 miR-7、KLF4 mRNA 表达水平比较以及转染 miR-7 mimics 组及其阴性对照组中 KLF4 mRNA 表达水平比较 转染 sh-hsa_circ_0001946 组 miR-7 表达水平为 2.119 ± 0.135 , 高于阴性对照组的 0.675 ± 0.139 , 差异有统计学意义 ($t=-22.351$, $P<0.05$); 而转染 sh-hsa_circ_0001946 组 KLF4 mRNA 表达水平为 0.752 ± 0.088 , 低于阴性对照组的 1.694 ± 0.141 , 差异有统计学意义 ($t=16.965$, $P<0.05$)。转染 miR-7 mimics 组 KLF4 mRNA 表达水平为 0.532 ± 0.151 , 低于阴性对照组的 1.619 ± 0.138 , 差异有统计学意义 ($t=15.966$, $P<0.05$)。上述结果提示在乳腺癌细胞株 MCF-7 中, 存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 的调控轴。

2.5 转染 sh-hsa_circ_0001946 组及其阴性对照组侵袭细胞数比较 转染 sh-hsa_circ_0001946 组侵袭细

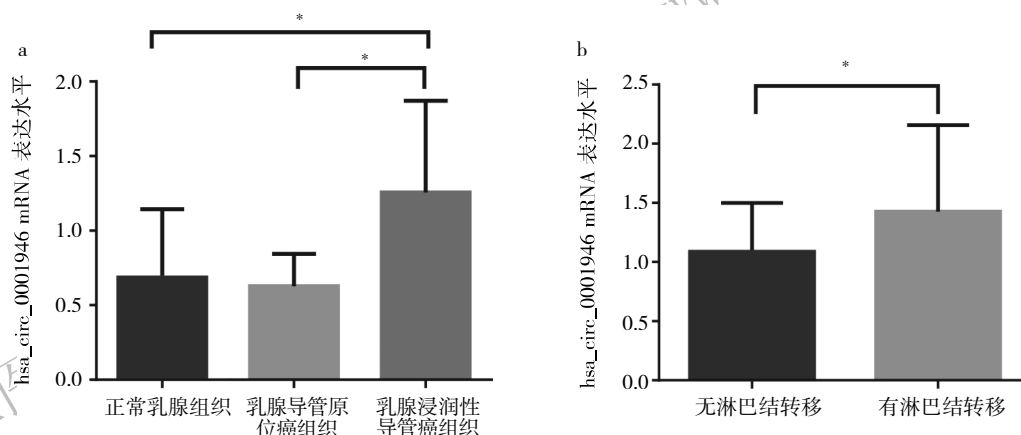


图 1 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 的表达与乳腺癌浸润和转移的关系(a: 正常乳腺组织、乳腺导管原位癌组织、乳腺浸润性导管癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平比较; b: 有无淋巴结转移的乳腺浸润性导管癌组织中 hsa_circ_0001946 mRNA 表达水平比较; * $P<0.05$)

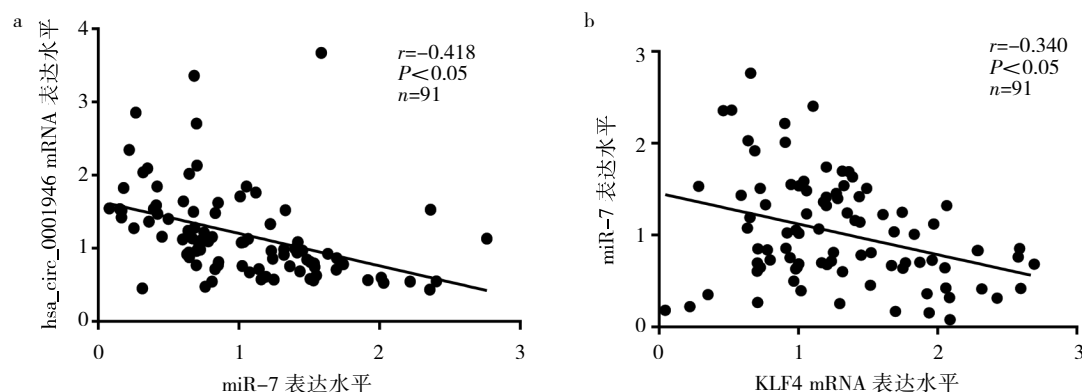


图 2 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946、miR-7、Kruppel 样因子 4 (KLF4) mRNA 表达的散点图(a: 乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 与 miR-7 表达的散点图; b: 乳腺癌组织中 miR-7 与 KLF4 mRNA 表达的散点图)

胞数为 54.220 ± 12.686 , 少于阴性对照组的 153.986 ± 16.733 , 差异有统计学意义 ($t=14.255, P<0.05$), 表明在乳腺癌细胞中, 通过抑制 hsa_circ_0001946 的表达, 可抑制癌细胞发生侵袭, 见图 3(插页)。

2.6 转染 KLF4 siRNA 组及其阴性对照组中 E-cadherin、N-cadherin mRNA 和蛋白表达水平比较 转染 KLF4 siRNA 组 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平均高于阴性对照组, N-cadherin mRNA 和蛋白表达水平均低于阴性对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 提示转染 KLF4 siRNA 组中癌细胞的 EMT 受到抑制, 见表 2 和图 4。

3 讨论

circRNA 是一种非编码 RNA, 缺乏 5' 和 3' 末端, 曾被认为没有生物学功能。而近年来, 越来越多的 circRNA 的生物学功能被发现, 研究显示, 许多 circRNA 在肿瘤中出现异常表达^[6-7], 并参与肿瘤的发生和发展, 包括细胞的增殖、侵袭和转移^[8]。进一步研究显示, circRNA 是通过海绵作用, 抑制 miRNA 的功能, 进而调节癌基因或者抑癌基因的表达来发挥生物学效应。Liu 等^[9]研究显示, 乳腺癌细胞及组织中 hsa_circ_001783 表达升高, 通过沉默 hsa_circ_001783 的表达, 可抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭, 进一步研究发现 hsa_circ_001783 是通过海绵吸附 miR-200c-3p 来发挥作用的。

近年研究显示, miR-7 通过抑制 ESAM 的表达来抑制乳腺癌干细胞发生转移^[2]; 研究还显示许多 circRNA

可调控 miR-7 的表达, 例如 hsa_circRNA_0006528^[10]、circ-TPGS2^[11]、Circ-TFCP2L1^[12], 那么, 是否还存在其他 circRNA 来调控 miR-7 的表达呢? 为了寻找新的具有调控 miR-7 的 circRNA, 笔者利用 starBase 数据库 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 进行检索, 结果显示, 在 5 大 miRNA 靶基因预测数据库中 (targetScan、picTar、RNA22、PITA、miRanda) 共有 784 条 circRNA, 其中 hsa_circ_0001946 与 miR-7 的结合位点最多, 共有 45 个可供结合的位点, 表明 hsa_circ_0001946 与 miR-7 具有很高的结合效率, 更为有效地调控 miR-7 的表达。因此笔者预测 hsa_circ_0001946 的靶点为 miR-7。

miR-7 是一种非编码小 RNA, 可负性调控靶基因的表达, 来抑制肿瘤的侵袭和转移。Zhu 等^[13]研究显示 miR-7-5p 可通过负性调控 METTL7B 靶基因, 来抑制甲状腺乳头状癌细胞的增殖和侵袭。Zheng 等^[14]研究显示 miR-7-5p 可通过抑制靶基因 OGT 的表达, 来抑制结直肠癌细胞的侵袭和转移。Huang 等^[15]研究显示 KLF4 是 miR-7 的靶基因, miR-7 通过负性调控 KLF4 的表达来调控食管鳞状细胞癌的侵袭和转移。同样, Dong 等^[16]在大肠癌中的研究也显示 KLF4 是 miR-7 的靶基因。而在乳腺癌细胞中, 研究显示 miR-7 表达下降^[1], KLF4 表达升高^[17], 提示在乳腺癌细胞中, KLF4 也可能是 miR-7 的靶基因, 进一步检索相关文献发现, 在乳腺癌干细胞中 miR-7 表达下降, 通过负性调节靶基因 KLF4, 导致癌基因 KLF4 表达升高, 促进癌细胞向颅脑转移^[18]。

众所周知, 干细胞在乳腺癌组织中比例极低, 上

表 2 转染 KLF4 siRNA 组及其阴性对照组中 E-cadherin、N-cadherin mRNA 和蛋白表达水平

组别	E-cadherin		N-cadherin	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
转染 KLF4 siRNA 组	1.864 ± 0.193	0.775 ± 0.123	0.422 ± 0.104	0.343 ± 0.102
阴性对照组	1.418 ± 0.127	0.534 ± 0.089	1.362 ± 0.152	0.520 ± 0.122
t 值	5.783	3.122	-15.288	-3.086
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: KLF4 为 Kruppel 样因子 4; siRNA 为小干扰 RNA; E-cadherin 为 E-钙黏蛋白; N-cadherin 为 N-钙黏蛋白

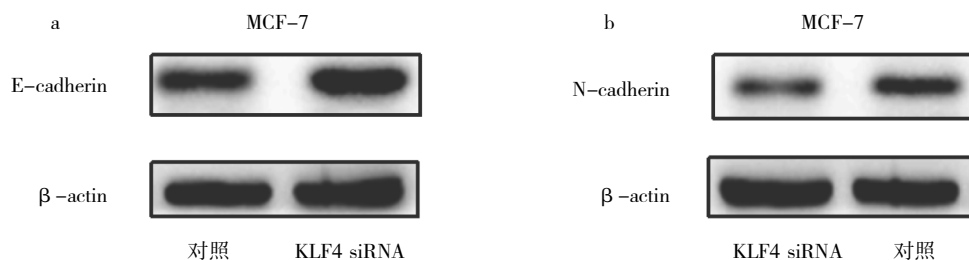


图 4 转染 Kruppel 样因子 4(KLF4)小干扰 RNA(siRNA)组及其阴性对照组中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)蛋白表达的电泳图(a: E-cadherin; b: N-cadherin)

述提到 miR-7 在干细胞中表达下降使其具有转移潜能,而在乳腺癌组织中占绝大比例的普通癌细胞中,其 miR-7 表达下降,是否也可通过上调 KLF4 的表达,促进癌细胞的侵袭和转移呢?因此,本研究提出如下假设:在普通乳腺癌细胞中存在一条新的调控轴,即 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4,上述的调控轴可调节乳腺癌细胞发生侵袭和转移。

本研究显示在 91 例乳腺癌组织中,hsa_circ_0001946 表达升高,miR-7 表达下降,KLF4 mRNA 表达升高。本研究还显示 hsa_circ_0001946 在乳腺浸润性导管癌中表达明显高于乳腺正常组织,提示 hsa_circ_0001946 表达的升高可促进乳腺癌发生侵袭。本研究还发现在有淋巴结转移的乳腺癌组织中 hsa_circ_0001946 表达明显高于无淋巴结转移的乳腺癌组织,提示 hsa_circ_0001946 表达升高可促进乳腺癌发生转移。进一步研究发现,在乳腺癌组织中 miR-7 的表达与 hsa_circ_0001946、KLF4 的表达均呈负相关,上述结果提示在乳腺癌组织中存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 调控轴,调控着乳腺癌细胞的侵袭和转移。

本研究继续在细胞水平验证 hsa_circ_0001946、miR-7、KLF4 的调控关系,通过转染实验发现在乳腺癌细胞株 MCF-7 中存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 的调控轴。为了进一步验证 hsa_circ_0001946 表达与乳腺癌细胞侵袭的关系,本研究采用 Transwell 侵袭实验,通过抑制 hsa_circ_0001946 的表达,可抑制癌细胞发生侵袭,因此,在乳腺癌细胞水平中也存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 的调控轴,此调控轴与癌细胞的侵袭有关。

KLF4 是一种转录因子,有研究认为 KLF4 具有抑癌基因的功能^[19]。在胃癌细胞中,KLF4 的表达可促进胃癌细胞发生 EMT,促进癌细胞发生转移^[20]。在头颈部鳞状细胞癌中,KLF4 表达也与肿瘤的 EMT 有关^[21]。EMT 指上皮细胞失去细胞之间的连接,获得间叶细胞的表型及侵袭、转移的能力,EMT 期间伴随着上皮细胞标志物 E-cadherin 和细胞角化蛋白表达的下降,间叶细胞标志物波形蛋白和 N-cadherin 表达的升高^[5],本研究探讨在乳腺癌细胞中 KLF4 的表达与 EMT 的关系,结果显示,与阴性对照组相比,转染 KLF4 siRNA 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin mRNA 及蛋白表达水平均升高,而 N-cadherin mRNA 及蛋白表达水平均下降,提示 KLF4 的表达可促进乳腺癌细胞发生 EMT,从而引起乳腺癌细胞发生侵袭和转移。

综上所述,在乳腺癌细胞中存在 hsa_circ_0001946/miR-7/KLF4 调控轴,激活上述调控轴,可使癌细胞中 hsa_circ_0001946 表达升高,使癌细胞发生 EMT,进而促进乳腺癌细胞发生侵袭和转移。

4 参考文献

- [1] Huang Q, Wu YY, Xing SJ, et al. Effect of miR-7 on resistance of breast cancer cells to adriamycin via regulating EGFR/PI3K signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5285-5292. DOI:10.26355/eurrev_201906_18195.
- [2] Li M, Pan M, Wang J, et al. miR-7 reduces breast cancer stem cell metastasis via inhibiting rela to decrease ESAM expression [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18:70-82. DOI:10.1016/j. omto. 2020. 06.002.
- [3] Lu J, Wang YH, Yoon C, et al. Circular RNA circ-RanGAP1 regulates VEGFA expression by targeting miR-877-3p to facilitate gastric cancer invasion and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2020, 471:38-48. DOI:10.1016/j.canlet.2019.11.038.
- [4] Huang MS, Liu JY. Hsa_circ_0001946 inhibits lung cancer progression and mediates cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer via the nucleotide excision repair signaling pathway [J]. *Front Oncol*, 2019, 9:508. DOI:10.3389/fonc.2019.00508.
- [5] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1420-1428. DOI:10.1172/ JCI39104.
- [6] Tang Q, Chen Z, Zhao L, et al. Circular RNA hsa_circ_0000515 acts as a miR-326 sponge to promote cervical cancer progression through up-regulation of ELK1[J]. *Aging*, 2019, 11 (22):9982-9999. DOI:10.18632/aging.102356.
- [7] Chen L, Yang X, Zhao J, et al. Circ_0008532 promotes bladder cancer progression by regulation of the miR-155-5p/miR-330-5p/MTGR1 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):94. DOI: 10.1186/s13046-020-01592-0.
- [8] Jiao J, Zhang T, Jiao X, et al. hsa_circ_0000745 promotes cervical cancer by increasing cell proliferation, migration, and invasion[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2):1287-1295. DOI:10.1002/ jcp.29045.
- [9] Liu Z, Zhou Y, Liang G, et al. Circular RNA hsa_circ_001783 regulates breast cancer progression via sponging miR-200c-3p [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2):55. DOI:10.1038/s41419-018-1287-1.
- [10] Gao D, Qi X, Zhang X, et al. hsa_circRNA_0006528 as a competing endogenous RNA promotes human breast cancer progression by sponging miR-7-5p and activating the MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(4): 554-564. DOI:10.1002/ mc.22950.
- [11] Wang S, Feng X, Wang Y, et al. Dysregulation of tumour microenvironment driven by circ-TPGS2/miR-7/TRAFF6/NF- κ B axis facilitates breast cancer cell motility[J]. *Autoimmunity*, 2021, 26:1-10. DOI: 10.1080/08916934.2021.1931843.

- [12] Wang Q, Li Z, Hu Y, et al. Circ-TFCP2L1 promotes the proliferation and migration of triple negative breast cancer through sponging miR-7 by inhibiting PAK1[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2019, 24(4):323-331. DOI:10.1007/s10911-019-09440-4.
- [13] Zhu J, Wang Y, Yang C, et al. circ-PSD3 promoted proliferation and invasion of papillary thyroid cancer cells via regulating the miR-7-5p/METTL7B axis[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 15:1-10. DOI:10.1080/10799893.2021.1910706.
- [14] Zheng W, Li H, Zhang H, et al. Long noncoding RNA RHPN1-AS1 promotes colorectal cancer progression via targeting miR-7-5p/OGT axis[J]. Cancer Cell Int, 2020, 18:20:54. DOI:10.1186/s12935-020-1110-9.
- [15] Huang H, Wei L, Qin T, et al. Circular RNA ciRS-7 triggers the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via miR-7/KLF4 and NF- κ B signals[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(1):73-80. DOI:10.1080/15384047.2018.1507254.
- [16] Dong M, Xie Y, Xu Y. miR-7-5p regulates the proliferation and migration of colorectal cancer cells by negatively regulating the expression of Krüppel-like factor 4[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3):3241-3246. DOI:10.3892/ol.2019.10001.
- [17] Jia Y, Zhou J, Luo X, et al. KLF4 overcomes tamoxifen resistance by suppressing MAPK signaling pathway and predicts good prognosis in breast cancer[J]. Cell Signal, 2018, 42:165-175. DOI:10.1016/j.cellsig.2017.09.025.
- [18] Okuda H, Xing F, Pandey PR, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4[J]. Cancer Res, 2013, 15, 73(4):1434-1444. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-2037.
- [19] Lin ZS, Chu HC, Yen YC, et al. Correction: krüppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression[J]. PLoS One, 2016, 11(4):e0154168. DOI:10.1371/journal.pone.0154168.
- [20] Zhang J, Zhu Z, Wu H, et al. PODXL, negatively regulated by KLF4, promotes the EMT and metastasis and serves as a novel prognostic indicator of gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2019, 22(1):48-59. DOI:10.1007/s10120-018-0833-y.
- [21] Ingruber J, Savic D, Steinbichler TB, et al. KLF4, Slug and EMT in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cells, 2021, 10(3):539. DOI:10.3390/cells10030539.

(收稿日期:2021-06-16)

(本文编辑:陈丽)

(上接第 2504 页)

- [28] Reignier J, Boisramé-Helms J, Brisard L, et al. Enteral versus parenteral early nutrition in ventilated adults with shock: a randomised, controlled, multicentre, open-label, parallel-group study (NUTRIREA-2)[J]. Lancet, 2018, 391(10116):133-143. DOI:10.1016/S0140-6736(17)32146-3.
- [29] Reintam Blaser A, Starkopf J, Alhazzani W, et al. Early enteral nutrition in critically ill patients: ESICM clinical practice guidelines[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3):380-398. DOI:10.1007/s00134-016-4665-0.
- [30] 孙仁华, 江荣林, 黄曼, 等. 重症患者早期肠内营养临床实践专家共识[J]. 中华危重病急救医学杂志, 2018, 30(8):715-721. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.08.001.
- [31] Emmauel W, Yaseen MA. Focus on gastrointestinal system in critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(9):1749-1752. DOI:10.1007/s00134-020-06128-w.
- [32] Okumura R, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers[J]. Inflamm Regen, 2018, 38:5. DOI:10.1186/s41232-018-0063-z.
- [33] McClave SA, Patel J, Bhutiani N. Should fecal microbial transplantation be used in the ICU? [J]. Curr Opin Crit Care, 2018, 24(2):105-111. DOI:10.1097/MCC.0000000000000489.
- [34] Nagpal R, Yadav H. Bacterial translocation from the gut to the distant organs: an over-view[J]. Ann Nutr Metab, 2017, 71 Suppl 1:11-16. DOI:10.1159/000479918.
- [35] Lobo DN, Bostock KA, Neal KR, et al. Effect of salt and water balance on recovery of gas-trointestinal function after elective colonic resection: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2002, 359(9320):1812-1818. DOI:10.1016/S0140-6736(02)08711-1.
- [36] Myles PS, Bellomo R, Corcoran T, et al. Restrictive versus liberal fluid therapy for major abdominal surgery[J]. N Engl J Med, 2018, 378(24):2263-2274. DOI:10.1056/NEJMoa1801601.
- [37] Barletta JF, Asgeirsson T, Senagore AJ. Influence of intravenous opioid dose on postoperative ileus[J]. Ann Pharmacother, 2011, 45(7-8):916-923. DOI:10.1345/aph.1Q041.
- [38] Wallström A, Frisman GH. Facilitating early recovery of bowel motility after colorectal surgery: a systematic review[J]. J Clin Nurs, 2014, 23(1-2):24-44. DOI:10.1111/jocn.12258.
- [39] Blaser AR, Preiser JC, Fruhwald S, et al. Gastrointestinal dysfunction in the critically ill: a systematic scoping review and research agenda proposed by the Section of Metabolism, Endo-crinology and Nutrition of the European Society of Intensive Care Medicine[J]. Critical Care, 2020, 24(1):224. DOI:10.1186/s13054-020-02889-4.

(本文由浙江省医学会推荐)

(收稿日期:2021-09-01)

(本文编辑:陈丽)