

# circTHBS1调节miR-135a-5p/RAB1A轴对乳腺癌 细胞恶性生物学行为的影响

张宏旭<sup>1</sup> 刘海旺<sup>2</sup> 王明辉<sup>1</sup> 刘汉成<sup>1</sup> 赵贺宇<sup>1</sup> 马立辉<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>承德医学院附属医院乳腺外科, 承德 067000; <sup>2</sup>承德医学院附属医院病理科, 承德 067000)

**摘要** 该文旨在探究环状RNA血栓反应蛋白-1(circTHBS1)调节微小RNA-135a-5p(miR-135a-5p)/Rab家族蛋白1A(RAB1A)轴对乳腺癌(BC)细胞恶性生物学行为的影响。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测BC细胞系中circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A mRNA的表达情况, 筛选最佳细胞系进行后续实验; 通过RNase R处理验证circTHBS1的环状结构。将MCF-7细胞分为Control组、sh-NC组、sh-THBS1组、sh-THBS1+inhibitor-NC组和sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor组。采用qRT-PCR检测转染效率; 采用双荧光素酶报告基因法确认circTHBS1和miR-135a-5p、miR-135a-5p和RAB1A的相互作用; Western blot法检测RAB1A在MCF-7细胞中的表达情况; 采用平板克隆法检测MCF-7细胞增殖情况; 使用流式细胞仪检测MCF-7细胞凋亡情况; 划痕实验检测MCF-7细胞迁移情况; Transwell法检测MCF-7细胞侵袭情况; 通过裸鼠移植瘤实验检测circTHBS1对瘤组织内BC细胞生长的影响。双荧光素酶报告基因实验结果显示, circTHBS1与miR-135a-5p、RAB1A与miR-135a-5p均具有靶向关系。与正常人乳腺上皮细胞MCF-10A相比, circTHBS1和RAB1A在BC细胞系中表达水平显著增加, miR-135a-5p表达水平显著下降( $P<0.05$ ); 敲低circTHBS1表达可以抑制MCF-7细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导MCF-7细胞凋亡( $P<0.05$ ); 抑制miR-135a-5p表达可逆转敲低circTHBS1表达对MCF-7细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用, 并抑制MCF-7细胞凋亡( $P<0.05$ ); 通过裸鼠移植瘤实验发现, 敲低circTHBS1表达后, 裸鼠BC瘤组织质量和体积下降, 同时RAB1A表达量下降, miR-135a-5p表达量升高( $P<0.05$ )。circTHBS1在BC细胞中高表达, 敲低circTHBS1可以通过调控miR-135a-5p/RAB1A轴抑制BC细胞的恶性生物学行为。

**关键词** 环状RNA血栓反应蛋白-1; 微小RNA-135a-5p; Rab家族蛋白1A; 乳腺癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

## Effect of circTHBS1 on Malignant Biological Behaviors of Breast Cancer Cells by Regulating miR-135a-5p/RAB1A Axis

ZHANG Hongxu<sup>1</sup>, LIU Haiwang<sup>2</sup>, WANG Minghui<sup>1</sup>, LIU Hancheng<sup>1</sup>, ZHAO Heyu<sup>1</sup>, MA Lihui<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Breast Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**Abstract** This study aims to investigate the effect of circTHBS1 (circular RNA thrombospondin-1) on the malignant biological behaviors of BC (breast cancer) cells by regulating the miR-135a-5p (microRNA-135a-5p)/RAB1A (Rab family protein 1A) axis. qRT-PCR (real-time fluorescence polymerase chain reaction) was used to detect the expression

收稿日期: 2024-08-07

接受日期: 2024-09-11

承德市科技计划自筹经费项目(批准号: 202204A050)资助的课题

\*通信作者。Tel: 15633142957, E-mail: malihui3939@sina.com

Received: August 7, 2024

Accepted: September 11, 2024

This work was supported by the Chengde City Science and Technology Plan Self-Financing Project (Grant No.202204A050)

\*Corresponding author. Tel: +86-15633142957, E-mail: malihui3939@sina.com

of circTHBS1, miR-135a-5p, and *RAB1A* mRNA in BC cell lines, and the optimal cell line was screened for subsequent experiments. MCF-7 cells were grouped into Control group, sh-NC group, sh-THBS1 group, sh-THBS1+inhibitor NC group, and sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor group. qRT-PCR was used to detect transfection efficiency. Dual luciferase reporter gene method was used to confirm the interaction between circTHBS1 and miR-135a-5p, miR-135a-5p and *RAB1A*. Western blot assay was used to detect the expression of *RAB1A* in MCF-7 cells. Plate cloning method was used to detect the proliferation of MCF-7 cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of MCF-7 cells. Scratch assay was used to detect the migration of MCF-7 cells. Transwell method was used to detect the invasion of MCF-7 cells. The nude mouse transplantation tumor experiment was used to detect the effect of circTHBS1 on the growth of BC cells in tumor tissue. The dual luciferase reporter gene assay found a targeted relationship between circTHBS1 and miR-135a-5p, *RAB1A* and miR-135a-5p. Compared with normal breast epithelial cells MCF-10A, the expression of circTHBS1 and *RAB1A* obviously increased in BC cell lines, while the expression of miR-135a-5p obviously decreased ( $P<0.05$ ). Knocking down the expression of circTHBS1 was able to inhibit the proliferation, migration, and invasion of MCF-7 cells, and induce MCF-7 cell apoptosis ( $P<0.05$ ). Inhibiting the expression of miR-135a-5p was able to reverse the inhibitory effect of knocking down circTHBS1 expression on the proliferation, migration, and invasion of MCF-7 cells, and inhibit MCF-7 cell apoptosis ( $P<0.05$ ). Through nude mouse transplantation experiments, it was found that knocking down the expression of circTHBS1 resulted in a decrease in the mass and volume of BC tumor tissue in nude mice, and a decrease in *RAB1A* expression and an increase in miR-135a-5p expression ( $P<0.05$ ). circTHBS1 is highly expressed in BC cells. Knocking down circTHBS1 can inhibit the malignant biological behaviors of BC cells by regulating the miR-135a-5p/*RAB1A* axis.

**Keywords** circular RNA thrombospondin-1; microRNA-135a-5p; Rab family protein 1A; breast cancer; proliferation; apoptosis; migration; invasion

乳腺癌(breast cancer, BC)是女性较为常见的恶性肿瘤之一,能够扩散到乳房组织以外,严重威胁着女性的身心健康和生命<sup>[1-2]</sup>。目前治疗BC的主要手段有全身化疗、外科手术、术后放疗、内分泌治疗和免疫治疗等。尽管治疗方法不断发展,但BC的治疗依然存在很大挑战。随着分子生物学研究的深入,对BC潜在靶点的探索取得了突破性进展,而靶向治疗是继手术、放疗、化疗之后的一种新兴治疗方法,具有特异性强、疗效显著、毒副作用小、对患者预后的改善作用显著等优点<sup>[3-5]</sup>。小分子非编码RNA(microRNA, miRNA)参与多种人类癌症的进展,比如miR-135a-5p通过调节Bcl-2相关永生基因3(Bcl-2 associated athanogene 3, BAG3)抑制BC细胞系的生长、迁移、侵袭和细胞周期进程<sup>[5]</sup>。迄今为止报道的大多数环状RNA(circular RNA, circRNA)属于非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA), circRNA是一类新发现的在真核生物中广泛表达的RNA,其异常表达与各种疾病的进展,特别是肿瘤的发生和发展密切相关。研究发现,环状RNA血栓反应蛋白-1(circular RNA thrombospondin-1, circTHBS1)可以通过吸附miR-129-5p调控SRY-box转录因子

4(SRY-box transcription factor 4, SOX4)的表达,从而促进非小细胞肺癌细胞增殖并抑制其凋亡<sup>[6]</sup>;在BC细胞中circTHBS1表达水平升高,且circTHBS1是由THBS1剪切后反向拼接而成的<sup>[7]</sup>。*RAB1A*是Rab家族的成员,固定在内质网和高尔基体的膜上,可介导囊泡从内质网向高尔基体的转运<sup>[8]</sup>。*RAB1A*的异常表达被证明与肿瘤进展有关<sup>[9]</sup>。通过前期生物信息学分析发现, circTHBS1可靶向调控miR-135a-5p, miR-135a-5p可与*RAB1A*靶向结合。本研究探究circTHBS1调节miR-135a-5p/*RAB1A*轴对BC细胞恶性生物学行为的影响,以期寻找BC的潜在生物标志物和治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

正常人乳腺上皮细胞(MCF-10A, 货号: BFN60805246)和人BC细胞系(MCF-7, 货号: BFN607200603; SK-BR-3, 货号: BFN60700185; MDA-MB-231, 货号: BFN608008564; T47D, 货号: BFN60805678)均购自中国科学院上海细胞库; Lipo6000™转染试剂、BeyoRT™ Q M-MLV反转录酶、总RNA抽提试剂(Trizol)、Annexin V-FITC

细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Taq DNA聚合酶、ECL试剂盒、qRT-PCR试剂均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 双荧光素酶试剂盒购自美国MedChemExpress公司; 兔抗RAB1A和GAPDH抗体均购自美国Abcam公司; miR-135a-5p抑制物(miR-135a-5p inhibitor)与其对照inhibitor-NC、miR-135a-5p模拟物(miR-135a-5p mimics)与其对照miR-NC以及靶向敲低circTHBS1的shRNA(sh-THBS1)与其对照sh-NC慢病毒载体均购自上海吉玛制药技术有限公司。QuantStudio™ 5实时荧光定量PCR系统、Nanodrop2000分光光度计、RIPA裂解和提取缓冲液、Attune™ NxT流式细胞仪均购自美国ThermoFisher Scientific公司; 光学显微镜购自日本KEYENCE公司; SDS-凝胶电泳仪购自英国Bio-Rad公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 qRT-PCR检测circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A表达水平** 将复苏后的BC细胞系(MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231、T47D)和MCF-10A细胞进行常规培养。当细胞密度达到50%~60%时,使用Trizol试剂提取细胞中的总RNA,将RNA逆转录为cDNA后,以cDNA为模板进行qRT-PCR扩增。扩增程序:95 °C预变性2 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸35 s,共35个循环。分别以GAPDH、U6为内参,其中GAPDH作为circTHBS1和RAB1A的内参,U6作为miR-135a-5p的内参。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A的相对表达量。circTHBS1:正向引物5'-ATG TGG CCT ACC CAG CTC AAG-3',反向引物5'-GCT GTT CCG ATG GTG TCT TT-3'; miR-135a-5p:正向引物5'-TTG GTC TTG TTT CCC GGT CC-3',反向引物5'-TCA CAG CTC CAC AGG CTA AC-3'; RAB1A:正向引物5'-CAG CAU GAA UCC CGA AUA UTT-3',反向引物5'-AUA UUC GGG AUU CAU GCU GTT-3'; GAPDH:正向引物5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3',反向引物5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3'; U6:正向引物5'-CTA GCT TCG GCA GCA CA-3',反向引物5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

**1.2.2 RNase R消化** 取部分RNA样品,加入1 μg RNase R(2 U/μg),于37 °C孵育1 h,并使用RNeasy MinElute清洁试剂盒纯化所得RNA(作为RNase R

组);另一部分RNA样品不用RNase R处理,作为Mock组。然后,将RNA逆转录为cDNA,并使用cDNA进行qRT-PCR,分析circTHBS1及其线性转录物THBS1表达情况。

**1.2.3 双荧光素酶报告基因实验** 构建含有miR-135a-5p结合位点的circTHBS1野生型质粒(circTHBS1-WT)和含有miR-135a-5p突变结合位点的circTHBS1突变型质粒(circTHBS1-MUT),将circTHBS1-WT和circTHBS1-MUT分别与miR-135a-5p mimics或miR-NC共转染于MCF-7细胞,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养48 h后,计算荧光素酶活性。荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性检测值/海肾荧光素酶活性检测值。

构建含有miR-135a-5p结合位点的RAB1A野生型质粒(RAB1A-WT)和不含有miR-135a-5p结合位点的突变型质粒(RAB1A-MUT),将RAB1A-WT和RAB1A-MUT分别与miR-135a-5p mimics或miR-NC共转染于MCF-7细胞,37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养48 h后,计算荧光素酶活性。

**1.2.4 细胞转染和分组** 将MCF-7细胞分为Control组(常规培养)、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-THBS1组(转染sh-THBS1)、sh-THBS1+inhibitor-NC组(转染sh-THBS1和抑制物阴性对照)和sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor组(转染sh-THBS1和miR-135a-5p抑制物),按照Lipo6000™转染试剂说明书进行转染。37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养6 h后,将培养基更换为含有血清的完全DMEM培养基。37 °C、5% CO<sub>2</sub>转染48 h后,qRT-PCR检测转染效率。

**1.2.5 蛋白印迹法(Western blot, WB)检测蛋白表达情况** 经裂解液裂解后,提取1.2.3转染后的各组MCF-7细胞总蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上,在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h,加稀释比例为1:500的RAB1A一抗,4 °C孵育过夜,加相应二抗(1:2 000)室温孵育2 h。用ECL试剂盒显色,分析蛋白条带的灰度值,计算目的蛋白的相对表达量。

**1.2.6 平板克隆法检测MCF-7细胞增殖情况** 将1.2.3转染后的MCF-7细胞分别以每皿1 000个细胞的密度转染于96孔板中,进行常规培养(37 °C、5% CO<sub>2</sub>),待细胞培养至克隆出现时终止培养,PBS冲洗,4%多聚甲醛室温固定20 min,室温下0.1%结晶紫染色10 min,PBS冲洗,晾干后用显微镜拍照,计算克隆形成数。

1.2.7 流式细胞仪检测MCF-7细胞凋亡情况 将1.2.3转染后的MCF-7细胞用胰酶于37 °C消化1 min, 接种到6孔板( $1 \times 10^6$ 个/孔)中进行常规培养, PBS清洗, 400 ×g室温离心5 min后弃上清, 调整细胞浓度, 取细胞悬液按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤进行检测, 使用流式细胞仪进行上机检测, 计算凋亡率。凋亡率为右上象限晚期细胞凋亡率和右下象限早期细胞凋亡率的和。

1.2.8 划痕愈合实验检测MCF-7细胞迁移情况 将1.2.3转染后的MCF-7细胞接种于6孔培养板( $1 \times 10^5$ /孔)中, 用移液器枪头对细胞进行划痕, 保持划痕垂直于6孔板背后的横线, 形成损伤后培养划痕融合。用40倍显微镜观察0 h和48 h时的划痕宽度(C), 计算划痕愈合率, 划痕愈合率= $[(C_0 - C_{48})/C_0] \times 100\%$ 。

1.2.9 Transwell小室实验检测MCF-7细胞侵袭情况 Transwell小室用基质胶包被, 调整1.2.3转染后的重悬MCF-7细胞浓度( $1 \times 10^5$ 个/mL), 将细胞接种至Transwell上室, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养24 h, 4%多聚甲醛室温固定15 min, 0.1%结晶紫染色20 min。显微镜观察, 并拍照记录。统计侵袭细胞数目。

1.2.10 裸鼠移植瘤实验 将12只雄性BALB/c裸鼠[购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(豫)2020-0005]随机分为两组。收集用sh-NC或sh-THBS1稳定转染的MCF-7细胞, 取200 mL含有 $2 \times 10^6$ 个细胞的悬浮液皮下植入裸鼠<sup>[10]</sup>。4周后, 将小鼠安乐死。本研究已通过承德医学院附属医院动物伦理委员会审核批准(批准号: CYFYLL2022463)。收集肿瘤组织称重并测量肿瘤体积。分别检测circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A的表达水平。

### 1.3 统计分析

采用Graphpad Prism 9.0进行统计分析, 实验数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用

单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组BC细胞中circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A mRNA表达水平比较

通过qRT-PCR检测了circTHBS1及其线性转录物THBS1在RNase R处理或不处理的MCF-7细胞中的表达情况。结果表明, 线性形式的THBS1可被RNase R消化, 而circTHBS1对RNase R核酸外切酶的消化具有抵抗力(表1)。与MCF-10A比较, circTHBS1和RAB1A mRNA在BC细胞中显著过表达, miR-135a-5p表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), MCF-7细胞中的circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A mRNA表达水平与MCF-10A差异最大(表2)。因此选择MCF-7细胞系用于后续实验。

### 2.2 miR-135a-5p和circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A之间的相互作用分析

通过生物学分析发现, miR-135a-5p和circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A 3'-UTR存在相互作用位点(图1)。与转染miR-NC和circTHBS1-WT或RAB1A-WT的MCF-7细胞相比, 转染miR-135a-5p mimics和circTHBS1-WT或RAB1A-WT的MCF-7细胞中荧光素酶活性降低( $P < 0.05$ ); 与转染miR-NC和circTHBS1-MUT或RAB1A-MUT的MCF-7细胞相比, 转染miR-135a-5p mimics和circTHBS1-MUT或RAB1A-MUT的MCF-7细胞中荧光素酶活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表3)。

### 2.3 circTHBS1敲低对miR-135a-5p和RAB1A表达的影响

与sh-NC组比较, sh-THBS1组中circTHBS1、RAB1A mRNA和RAB1A蛋白表达水平均下调, miR-135a-5p表达上调( $P < 0.05$ ); 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较, sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor组

表1 circTHBS1及其线性转录物THBS1表达比较

Table 1 Comparison of expression of circTHBS1 and its linear transcript THBS1

组别 Groups	circTHBS1	THBS1
Mock	1.00±0.11	1.02±0.08
RNase R	0.96±0.23	0.29±0.04*
<i>t</i>	0.384	19.992
<i>P</i>	0.709	<0.001

$n=6$ ; \* $P < 0.05$ , 与Mock组比较。

$n=6$ ; \* $P < 0.05$  compared with Mock group.

表2 各组BC细胞中circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A mRNA表达水平比较

Table 2 Comparison of circTHBS1, miR-135a-5p and RAB1A mRNA expression levels in BC cells of each group

细胞系 Cell lines	circTHBS1	miR-135a-5p	RAB1A mRNA
MCF-10A	1.05±0.09	1.09±0.09	1.07±0.09
MCF-7	2.72±0.26*	0.33±0.03*	2.98±0.29*
SK-BR-3	1.66±0.16*	0.69±0.06*	1.76±0.17*
MDA-MB-231	2.48±0.24*	0.41±0.04*	2.78±0.27*
T47D	1.77±0.17*	0.53±0.05*	2.17±0.21*
<i>F</i>	71.856	162.395	75.746
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

*n*=6; \**P*<0.05, 与MCF-10A比较。

*n*=6; \**P*<0.05 compared with MCF-10A.

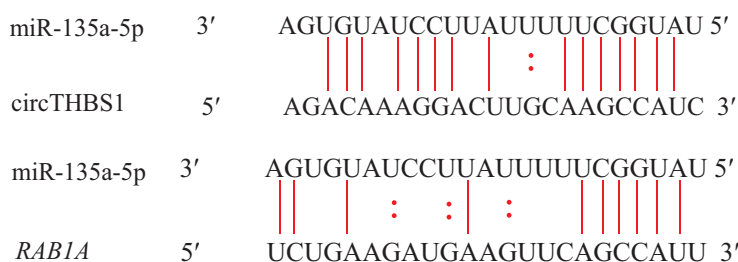


图1 生物学分析miR-135a-5p和circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A相互结合位点

Fig.1 Biological analysis of binding sites between miR-135a-5p and circTHBS1, miR-135a-5p and RAB1A

表3 双荧光素酶活性结果分析

Table 3 Analysis of the results of double luciferase activity

组别 Groups	circTHBS1-WT	circTHBS1-MUT	RAB1A-WT	RAB1A-MUT
miR-NC	1.00±0.00	0.98±0.02	1.00±0.00	0.99±0.02
miR-135a-5p mimics	0.42±0.04*	0.96±0.04	0.47±0.04*	0.97±0.03
<i>t</i>	32.423	1.000	29.628	1.240
<i>P</i>	<0.001	0.347	<0.001	0.250

*n*=6; \**P*<0.05, 与miR-NC组比较。

*n*=6; \**P*<0.05 compared with miR-NC group.

RAB1A mRNA和RAB1A蛋白水平均上调, miR-135a-5p表达下调(*P*<0.05)(图2和表4)。

#### 2.4 circTHBS1敲低对MCF-7细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

与sh-NC组比较, sh-THBS1组中MCF-7细胞克隆数、细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量降低, 细胞凋亡率升高(*P*<0.05); 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较, sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor组细胞克隆数、细胞划痕愈合率、细胞侵袭数量增加, 细胞凋亡率下降(*P*<0.05)(图3~图6)。

#### 2.5 敲低circTHBS1对裸鼠移植瘤的影响

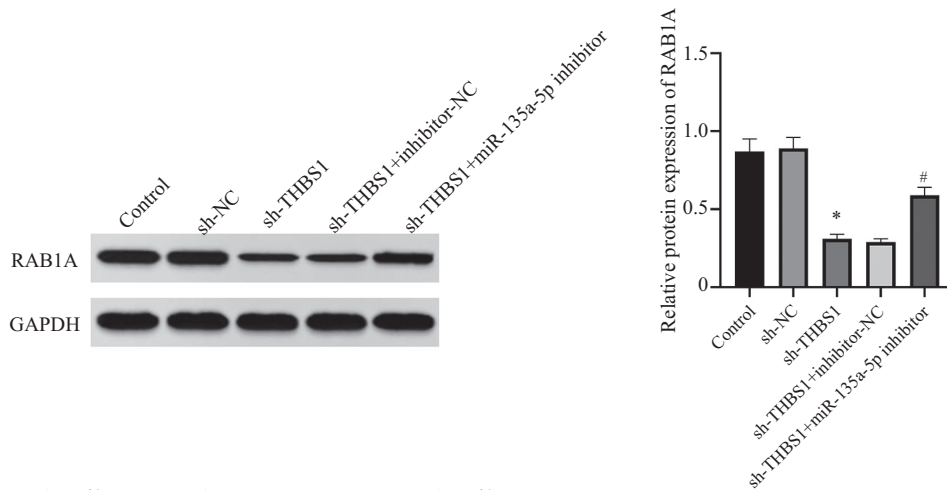
与sh-NC组比较, sh-THBS1组裸鼠移植瘤质量与体积降低(*P*<0.05)(图7)。与sh-NC组比较, sh-

THBS1组瘤组织中circTHBS1和RAB1A表达下调, miR-135a-5p表达上调(*P*<0.05)(图8和表5)。

### 3 讨论

世卫组织相关数据显示, 全球BC的发病率每年都在上升, BC严重影响女性的身心健康<sup>[1]</sup>。随着分子生物学研究的深入, 对BC潜在靶点的探索取得了突破性进展。BC的发生和发展涉及原癌基因的激活和抑癌基因的失活, 随后是信号通路的失调, 最后是细胞表型的改变。目前, 靶向治疗是一种治疗癌症的新兴治疗方法, 具有特异性强、疗效显著、毒副作用小、对患者预后的改善作用显著等优点。

研究证实circRNA在BC中存在差异表达, 且可



$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较; # $P<0.05$ , 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group; # $P<0.05$  compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

图2 RAB1A蛋白表达情况

Fig.2 Expression of RAB1A protein

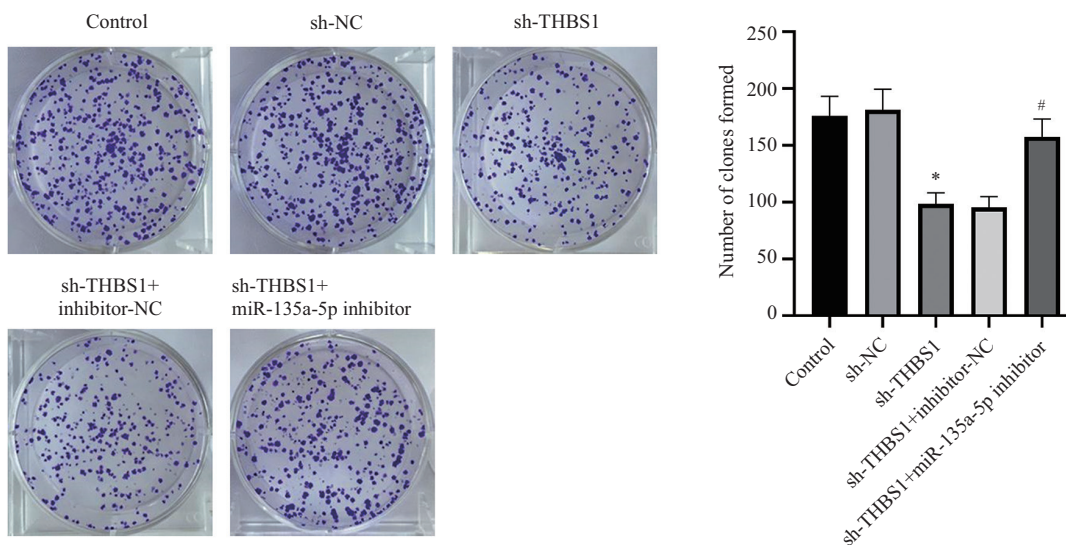
表4 circTHBS1、miR-135a-5p和RAB1A表达情况

Table 4 Expression of circTHBS1, miR-135a-5p and RAB1A

组别 Groups	circTHBS1	miR-135a-5p	RAB1A mRNA
Control group	1.03±0.07	1.06±0.09	1.04±0.08
sh-NC group	1.04±0.08	1.05±0.05	1.07±0.04
sh-THBS1 group	0.48±0.04*	1.89±0.16*	0.43±0.03*
sh-THBS1+inhibitor-NC group	0.45±0.03	1.83±0.18	0.41±0.04
sh-THBS1+miR-135a-5p inhibitor group	0.43±0.04	1.51±0.15#	0.83±0.08#
<i>F</i>	198.370	53.684	182.272
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较; # $P<0.05$ , 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group; # $P<0.05$  compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

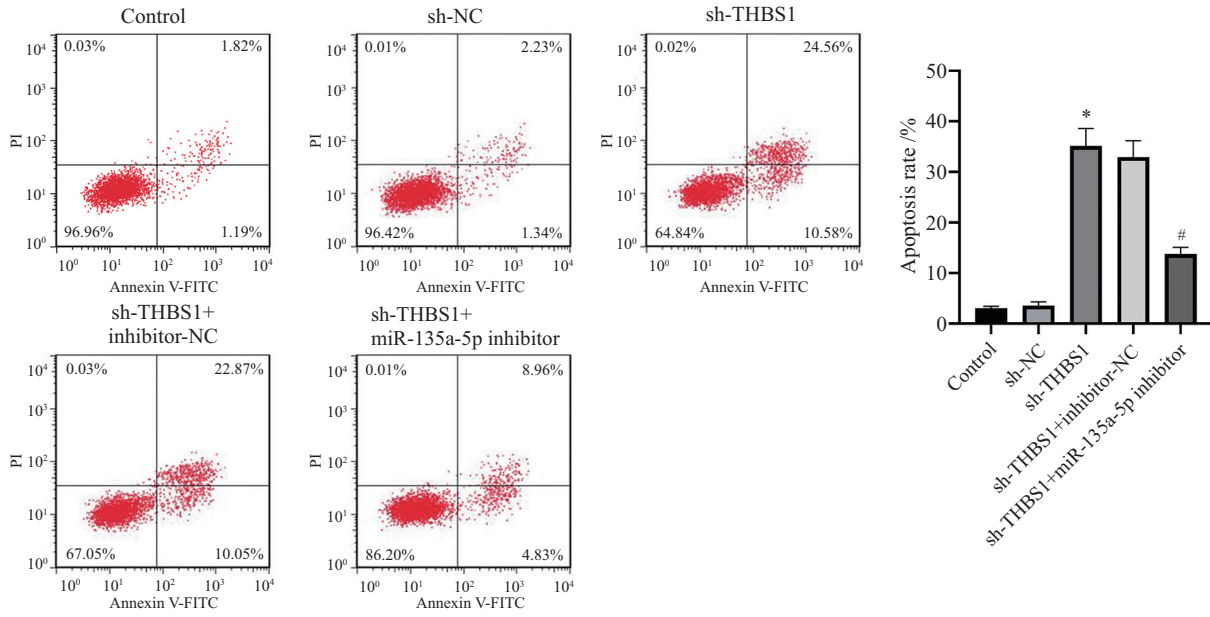


$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较; # $P<0.05$ , 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group; # $P<0.05$  compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

图3 各组MCF-7细胞增殖情况

Fig.3 Proliferation of MCF-7 cells in each group

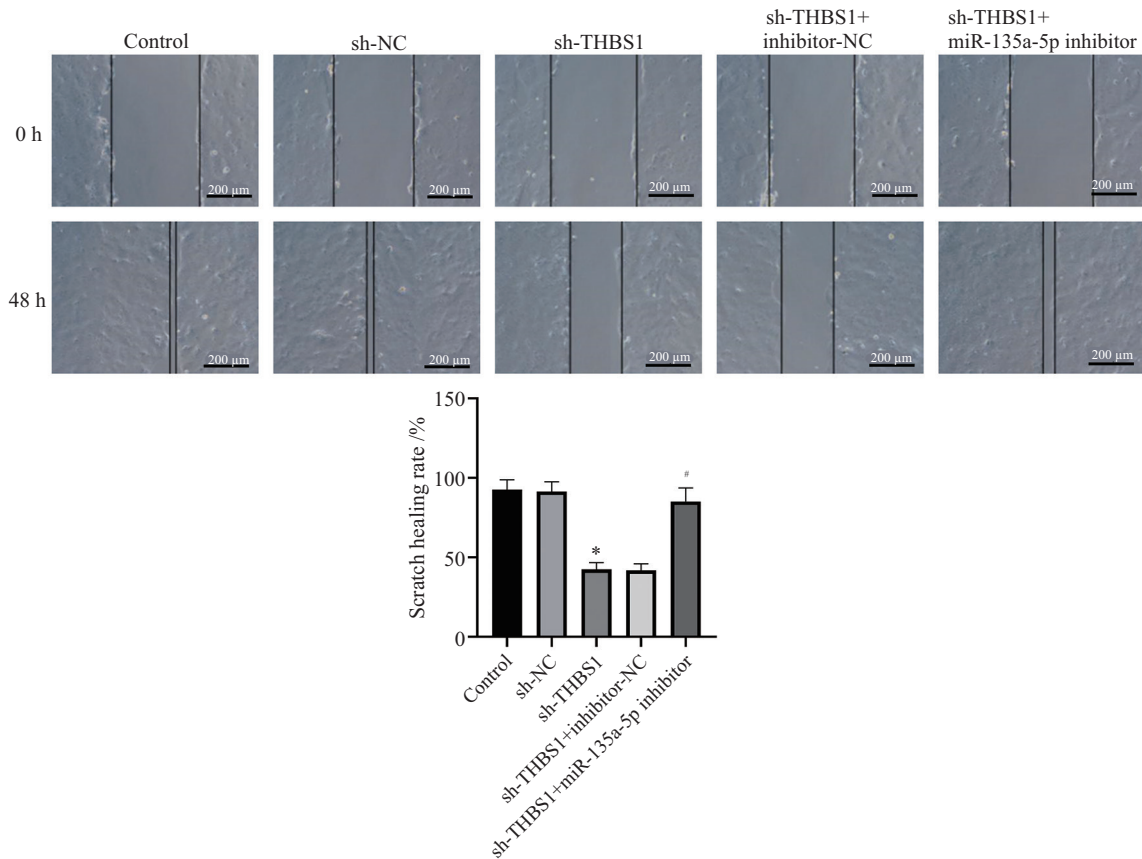


n=6; \*P<0.05, 与sh-NC组比较; #P<0.05, 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

n=6; \*P<0.05 compared with sh-NC group; #P<0.05 compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

图4 各组MCF-7细胞凋亡情况

Fig.4 Apoptosis of MCF-7 cells in each group

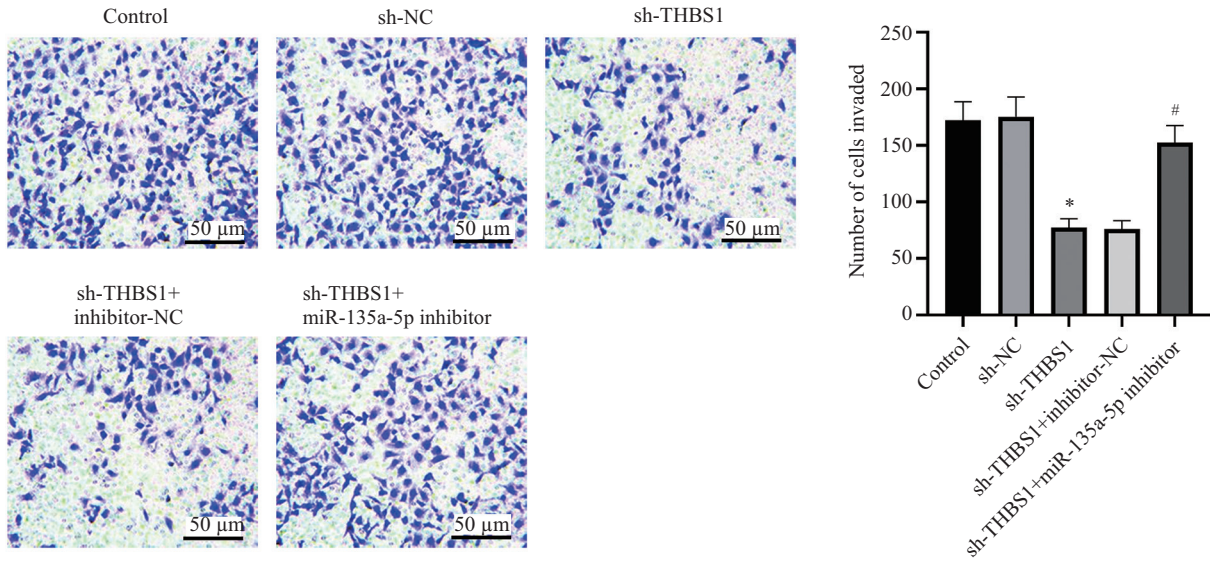


n=6; \*P<0.05, 与sh-NC组比较; #P<0.05, 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

n=6; \*P<0.05 compared with sh-NC group; #P<0.05 compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

图5 各组MCF-7细胞迁移情况

Fig.5 MCF-7 cell migration in each group

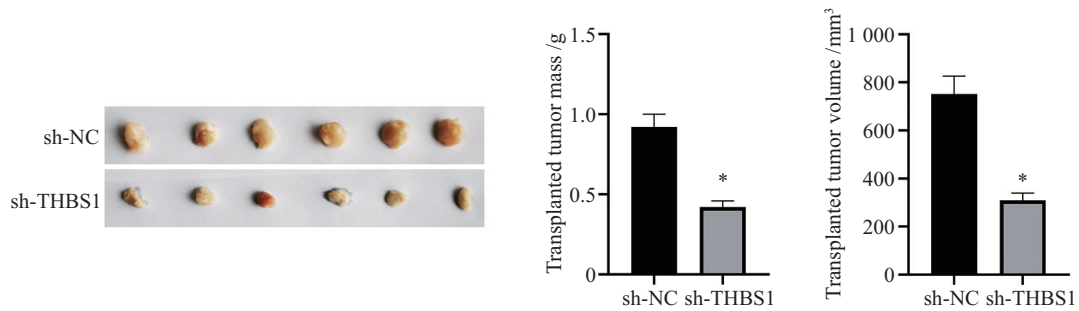


$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较; # $P<0.05$ , 与sh-THBS1+inhibitor-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group; # $P<0.05$  compared with sh-THBS1+inhibitor-NC group.

图6 各组MCF-7细胞侵袭情况

Fig.6 Invasion of MCF-7 cells in each group

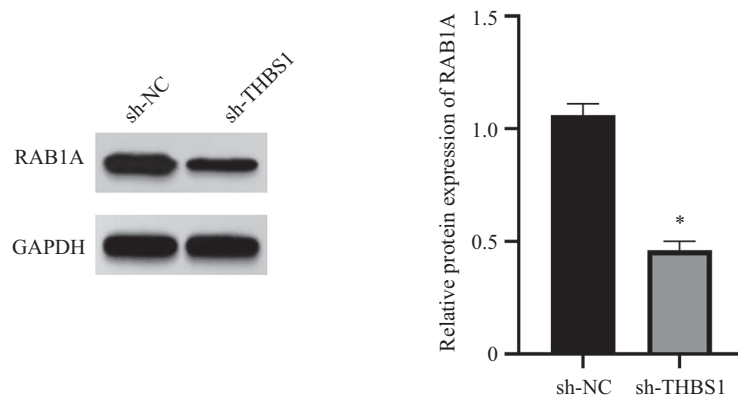


$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group.

图7 两组裸鼠移植瘤体图

Fig.7 Tumor body of nude mice in two groups



$n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与sh-NC组比较。

$n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with sh-NC group.

图8 移植瘤内RAB1A表达情况

Fig.8 RAB1A expression in transplanted tumors



表5 两组小鼠移植瘤质量、移植瘤体积及移植瘤组织中circTHBS1、miR-135a-5p的表达情况  
Table 5 The weight and volume of transplanted tumor and the expression of circTHBS1 and miR-135a-5p in transplanted tumor tissue of mice in two groups

组别 Groups	移植瘤质量/g Transplanted tumor mass /g	移植瘤体积/mm <sup>3</sup> Transplanted tumor volume /mm <sup>3</sup>	circTHBS1	miR-135a-5p
sh-NC group	0.92±0.08	750.85±75.08	1.03±0.02	1.05±0.04
sh-THBS1 group	0.42±0.04*	309.26±30.03*	0.39±0.03*	1.86±0.18*
<i>t</i>	13.693	13.377	43.479	-10.760
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*n*=6; \**P*<0.05, 与sh-NC组比较。

*n*=6; \**P*<0.05 compared with sh-NC group.

以调控BC的发生、转移、侵袭和耐药,表明circRNA可作为BC的诊断生物标志物和治疗靶点<sup>[12]</sup>。RNA研究的最新进展表明, circRNA是一类在真核生物中广泛表达的RNA,与肿瘤的发生和发展密切相关,比如circRNF20可通过上调miR-766-5p并抑制亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)的表达,从而抑制BC细胞恶性生物学行为<sup>[13]</sup>。circTHBS1通过吸附miR-129-5p来调控SOX4的表达,进而促进非小细胞肺癌细胞增殖和凋亡<sup>[6]</sup>;本研究的结果与此一致, circTHBS1在BC细胞中显著过表达,敲低circTHBS1表达可以抑制MCF-7细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导凋亡。

miRNA可结合靶mRNA的3'-UTR的特定互补序列,来调控细胞转录和蛋白编码翻译<sup>[14]</sup>,导致mRNA降解,抑制蛋白翻译,miRNA可作为肿瘤启动子或抑制子,参与多种人类癌症的进展,有研究表明,miR-135a-5p的过表达可抑制人结肠癌SW620细胞的增殖和侵袭,并诱导凋亡<sup>[15]</sup>; miRNA-26b可通过下调MALAT-1,抑制乳腺癌MCF-7细胞恶性生物学行为<sup>[16]</sup>; miR-135a-5p调节BAG3抑制BC细胞系的生长、迁移、侵袭和细胞周期进程<sup>[5]</sup>。本研究中,miR-135a-5p在MCF-7细胞中表达水平下降。通过生物信息学分析发现, circTHBS1与miR-135a-5p具有结合位点,存在调控关系,抑制miR-135a-5p表达可逆转敲低circTHBS1表达对MCF-7细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用,并抑制MCF-7细胞凋亡,推测circTHBS1靶向调控miR-135a-5p表达参与BC进展。

RAB1A是Rab家族的成员,被认为是一种可以调控细胞膜动态的管家蛋白。研究表明, RAB1A参与肿瘤细胞的恶性生物学行为,其表达量增加与预后不良有关,因此, RAB1A可能成为针对肿瘤患者诊断、治疗和预后的一种新标志物,针对RAB1A的分子靶向药

物的设计与开发将有助于提高癌症患者的生存率,并改善预后不良<sup>[17]</sup>。研究显示circUGGT2沉默可以通过调节miR-526b-5p/RAB1A轴,来抑制肝癌的发展,为肝癌治疗提供了靶点<sup>[8]</sup>; circ\_0000218上调RAB1A,并通过海绵miR-139-3p促进结直肠癌的增殖和转移<sup>[18]</sup>; RAB1A可通过上调Gli1来促进结直肠癌细胞的增殖和迁移<sup>[19]</sup>。本研究中结果显示RAB1A mRNA和蛋白在MCF-7细胞中高表达, circTHBS1通过抑制miR-135a-5p表达,促进RAB1A在MCF-7细胞中表达,进而影响BC的发展。通过裸鼠移植瘤实验发现,敲低circ-THBS1表达后,裸鼠BC瘤组织质量和体积下降,同时RAB1A表达量下降,miR-135a-5p表达水平升高,这表明circTHBS1可能靶向调节miR-135a-5p/RAB1A轴从而干扰瘤组织中BC细胞的生长。

综上,本研究证明了敲低circTHBS1表达抑制BC细胞增殖、迁移和侵袭,诱导凋亡,是通过抑制miR-135a-5p/RAB1A轴来实现的, circTHBS1可能作为BC的治疗靶点和潜在的生物标志物。本研究还存在不足之处,仅在一种细胞系中探讨了circTHBS1对BC细胞恶性生物学行为的影响,并仅在细胞水平及体内实验中检测了RAB1A的表达情况,但未通过回复实验证实miR-135a-5p与RAB1A的靶向作用,对于circTHBS1的其他作用机制也尚未进行深入研究。因此,仍需要后续研究验证circTHBS1的作用机制,以期寻找BC的潜在生物标志物和治疗靶点。

## 参考文献 (References)

- [1] RACHMAN A, FIANTORO Z H, SUTANDYO N, et al. Metabolic profile and negatively association between insulin resistance and metastatic incidence in indonesian primary invasive breast cancer: a cross-sectional study [J]. *Int J Gen Med*, 2023, 16(1): 3257-65.
- [2] ARNOLD M, MORGAN E, RUMGAY H, et al. Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040

- [J]. *Breast*, 2022, 66(1): 15-23.
- [3] PARK M, KIM D, KO S, et al. Breast cancer metastases: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6806.
- [4] MAMPRE D, MEHKRI Y, RAJKUMAR S, et al. Treatment of breast cancer brain metastases: radiotherapy and emerging pre-clinical approaches [J]. *Diagn Ther*, 2022(1): 25-38.
- [5] ZHANG H, WANG M, LANG Z, et al. MiR-135a-5p suppresses breast cancer cell proliferation, migration, and invasion by regulating BAG3 [J]. *Clinics*, 2023, 77(1): 100115.
- [6] CHEN H, WU G, CHEN G, et al. Circular RNA THBS1 promotes proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by sponging miR-129-5p and regulating SOX4 expression [J]. *J buon*, 2020, 25(1): 1721-7.
- [7] 祝灵平. Circular RNA THBS1通过吸附miR-129-5p调节基因SOX4表达而促进乳腺癌细胞的迁移侵袭[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [8] KONG Q, FAN Q, MA X, et al. CircRNA circUGGT2 contributes to hepatocellular carcinoma development via regulation of the miR-526b-5p/RAB1A axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020(1): 10229-41.
- [9] WANG J, XING H, NIKZAD A A, et al. Long noncoding RNA MNX1 antisense RNA 1 exerts oncogenic functions in bladder cancer by regulating miR-218-5p/RAB1A axis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(3): 237-47.
- [10] 刘佳玮, 李菲, 何玉莲, 等. CircACTN4调节miR-424-5p/MTHFR轴对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *广西医科大学学报*(LIU J W, LI F, HE Y L, et al. Effects of circACTN4 regulation of miR-424-5p/MTHFR axis on proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells [J]. *Journal of Guangxi Medical University*), 2022, 39(10): 1585-91.
- [11] SUNG H, FERLAY J, SHEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [12] 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)*(YANG Q, WANG C, LIN B H, et al. The role of circ\_0000515/miR-1296-5p/CDK2 axis in breast cancer [J]. *Journal of Jiangsu University, Medicine Edition*), 2023, 33(4): 317-22.
- [13] 张志慧, 王静雅, 戚桂杰, 等. circRNF20/miR-766-5p/MTHFR轴对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*(ZHANG Z H, WANG J Y, QI G J, et al. Influence of circRNF20/miR-766-5p/MTHFR axis on malignant biological behaviors of breast cancer cells [J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*), 2023, 31(3): 469-76.
- [14] 何华美, 陆巍. miR-135a-5p通过调控CXCL12表达降低吗啡耐受[J]. *基础医学与临床*(HE H M, LU W. miR-135a-5p alleviates morphine tolerance by targeting the regulation of CXCL12 expression [J]. *Basic and Clinical Medicine*), 2024, 44(5): 665-72.
- [15] WANG J, YANG J, ZHANG H, et al. Effects of miR-135a-5p and miR-141 on proliferation, invasion and apoptosis of colorectal cancer SW620 cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 914-20.
- [16] 阮思蓓, 熊小明, 赵梓亦, 等. MicroRNA-26b下调MALAT-1抑制乳腺癌MCF-7细胞恶性生物学行为的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*(RUAN S B, XIONG X M, ZHAO Z Y, et al. MicroRNA-26b inhibits the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells by down-regulating MALAT-1 [J]. *China Journal of Modern Medicine*), 2024, 34(12): 17-23.
- [17] 卫诗慧, 廖争光, 杨梅, 等. RAB1A在肿瘤发生发展中的作用研究进展[J]. *现代肿瘤医学*(WEI S H, LIAO Z G, YANG M, et al. Research progress on the role of RAB1A in the development of tumor [J]. *Journal of Modern Oncology*), 2022, 30(20): 3794-9.
- [18] PEI F L, CAO M Z, LI Y F. Circ\_0000218 plays a carcinogenic role in colorectal cancer progression by regulating miR-139-3p/RAB1A axis [J]. *J Biochem*, 2020, 167(1): 55-65.
- [19] PENG C, LI X, YE Z, et al. Rab1A promotes cell proliferation and migration by upregulating Gli1 in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16243.