

环状 RNA 在乳腺癌中作用的研究进展

何 啸, 胡为杰, 吕文昌, 任玉萍, 吴 敏, 吴毅平, 张 奇*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 整形美容外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:环状 RNA(circRNA)是一类具有环状结构且广泛存在的非编码 RNA,具有多样性、特异性、保守性和稳定性等特征。作为新兴的非编码调控分子,circRNA 主要通过竞争性内源 RNA 的机制来调控乳腺癌(BC)细胞增殖和转移,并且参与了多种化学药物治疗耐药、影响疗效。阐明 circRNA 在 BC 中的功能与机制,将有助于为 BC 的诊断和治疗提供新颖有效的策略。

关键词: 乳腺癌;环状 RNA;竞争性内源 RNA;化学治疗耐药

中图分类号:R737.9 文献标志码:A

Advances on the roles of circular RNA in breast cancer

HE Xiao, HU Wei-jie, LYU Wen-chang, REN Yu-ping, WU Min, WU Yi-ping, ZHANG Qi*

(Department of Plastic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Circular RNA (circRNA) is a kind of non-coding RNA with circular structure and is found in a variety of cell types. CircRNA is characterized by diversity, specificity, conservatism and stability. As an emerging non-coding regulatory molecules, circRNA can regulate the proliferation and metastasis of breast cancer (BC) mainly through the mechanism of competitive endogenous RNA, and is involved in a variety of chemotherapy resistance and affect the efficacy. Elucidating the functions and mechanisms of circRNA in BC may provide novel and effective strategies for the diagnosis and treatment of BC.

Key words: breast cancer; circular RNA; competitive endogenous RNA; chemotherapy resistance

乳腺癌(breast cancer, BC)是中国女性发病率最高的癌,并且是导致癌死亡的主要原因^[1]。乳腺癌有 5 种基因分型,主要包括管腔上皮 A 型、管腔上皮 B 型、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 过表达型、基底样型和正常乳腺样型。此外,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)具有高转移、复发等恶性特征,其免疫组织化学定义是雌激素受体、孕激素受体和 HER2 的表达缺失,且其中 50%~75% 的

TNBC 为基底样型^[2]。乳腺癌具有高复发性、高转移性及耐药性等特征,仍是当前亟待解决的难题。基于新型肿瘤分子靶点的发现与机制研究,对乳腺癌治疗具有重要的意义。内源性环状 RNA(circular RNA, circRNA)为一类新型的非编码 RNA,在果蝇、小鼠、人类等多种物种中均有表达。最新研究表明, circRNA 参与了乳腺癌发生、发展和转移并干预乳腺癌治疗效果。因此,本文主要综述了近年来 circRNA 在乳腺癌中的作用机制和耐药的研究进展。

收稿日期:2020-09-15 修回日期:2021-04-06

基金项目:中国光华科技基金会(2019JZXM001);2020 年武汉市科技局应用基础前沿专项(2020020601012241)

* 通信作者(corresponding author): zhangqi06172@163.com

译 circRNA 在乳腺癌中的功能与机制,将有助于实现对乳腺癌肿瘤本质的新认识,提供新颖的乳腺癌治疗策略。

1 CircRNA 分类和形成

CircRNA 根据其组成可分为 3 种类型:外显子 circRNA (exonic circRNA, ecircRNA)、内含子 circRNA (circular intronic RNA, ciRNA) 和外显子-内含子 circRNA (exon-intronic circRNA, EIciRNA)^[3]。CircRNA 的形成是一种可变的环化剪接,根据剪接位点的不同,产生不同类型的 circRNA,主要包括三种机制:外显子跳跃、直接反向剪接和依赖 RNA 结合蛋白(RNA binding protein, RBP)剪接。外显子跳跃指的是 pre-mRNA 在转录过程中被部分折叠,导致下游外显子的 3-SD (splicing donor) 与上游外显子的 5'-SA (splicing acceptor) 连接,形成既包含外显子又包含内含子的 RNA 套索,移除内含子后,最终形成 ecircRNA。直接反向剪接则是 pre-mRNA 的侧翼内含子互补序列通过直接碱基配对形成套索,通过去除或保留内含子可分别形成 ecircRNA 或 EIciRNA。依赖 RBP 剪接是指, RBP 与外显子两侧的内含子上、下游碱基序列结合,拉进两侧内含子之间的距离,形成 circRNA。

2 CircRNA 主要特征

CircRNA 具有多样性、特异性、保守性和稳定性等特征。就多样性而言, circRNA 广泛表达于多种原生生物、真菌、果蝇、植物和人类等生命体。CircRNA 也存在于人体多种体液、组织和器官中。在一些特殊情况下,单个细胞中 circRNA 比相关的信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 更为丰富。CircRNA 具有特异性,即不同细胞、组织中,或者同一组织正常和病理状态中,存在差异性的 circRNA 表达谱,并且会随着细胞周期进程发生变化。例如, circRNA 在幼猪脑发育过程中呈时空动态性变化^[4]。CircRNA 表达谱在各物种之间具有保守性,不仅在哺乳动物中是保守的,且在进化上相对较远的果蝇间也具有保守性。CircRNA 是 RNA 剪接的保守且非随机产物,与 ALU 重复有关,并参与调控基因表达^[5]。有意思的是,在猪中的大约 20% 与 circRNA 生成相关的剪切位点在老鼠和人类中也有

相同的功能^[6]。此外, circRNA 通过 5' 与 3' 端首尾相连共价闭合形成环状分子,在结构上缺乏易被降解的 3' 端 poly 尾。因此, circRNA 在一定程度上可避免被 RNA 外切酶降解,并通过 RNA 折叠维持基因结构,使得 circRNA 具有较高的稳定性。

3 CircRNA 调控机制

CircRNA 主要通过竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)、结合 RBP、调节转录和翻译以及生成假基因来发挥调控作用。CeRNA 功能是 circRNA 最经典的肿瘤学作用机制,即 circRNA 可通过碱基互补配对竞争性结合微小 RNA (microRNA, miRNA),对 miRNA 产生“海绵作用”,抑制 miRNA 的负性调节作用,从而提高相应 mRNA 的胞内浓度并调节细胞功能(图 1)。RBP 是一类可以结合 RNA 并协助调控基因转录和翻译的蛋白质,在 circRNA 的剪接、处理、折叠、稳定和定位中发挥重要作用。CircRNA 与 RBP 的结合同样参与了调控肿瘤进展。EIciRNA 主要定位在细胞核中,可与 U1 核小 RNA 结合形成复合体,再与转录复合物启动子 Pol II 相互作用,最终促进亲本基因表达^[7]。一些位于细胞质的内源性 circRNA 具有合适的结构和翻译长度,这表明 circRNA 具有一定的蛋白质编码潜力^[8]。然而关于乳腺癌中 circRNA 翻译功能的研究还尚未见诸报道。CircRNA 可通过反转录形成假基因,而假基因可调控 DNA、RNA 和蛋白质水平并广泛存在于多种肿瘤中。目前关于 circRNA 和假基因的研究非常少,有待进一步探索。

4 CircRNA 在乳腺癌 (BC) 中作用的相关机制

4.1 CircRNA 调控乳腺癌 (BC) 细胞增殖

在 TNBC 中, circRNA 可以通过多种方式调节癌细胞增殖。Circ-TFCP2L1 在 TNBC 中显著上调,导致 TNBC 患者的无病生存时间缩短。Circ-TFCP2L1 通过海绵化 miR-7 来降低 PAK1 的表达,从而诱导 TNBC 的增殖和迁移^[9]。CircPLK1 通过竞争性结合 miR-296-5p,增加 Plk1 合成,最终可促进细胞增殖^[10];CircAGFG1 作为 miR-195-5p 的“海绵”,可缓解 miR-195-5p 对 CCNE1 的抑制作用,从而加速细胞分裂和增殖^[11]。CircRNA_069718 在 TNBC 组织和

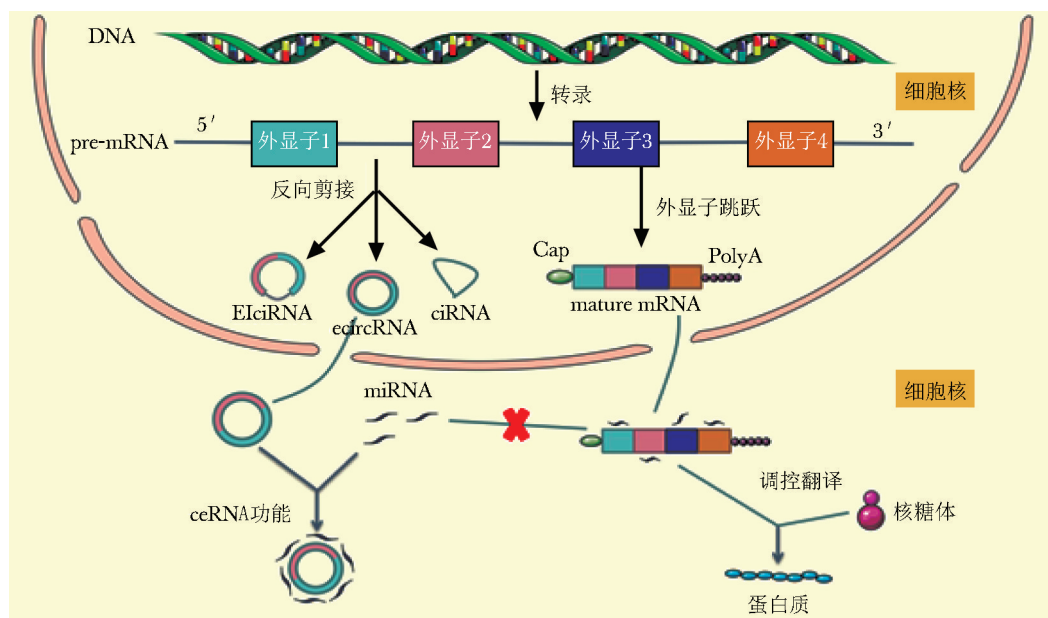


图1 CircRNA 最主要的肿瘤学作用机制

Fig 1 Most important oncological mechanism of circRNA

细胞中表达明显增加,降低 circRNA_069718 的表达可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来减少 β -catenin、原癌基因、cyclin D1 的表达,进而抑制 TNBC 的增殖^[12]。与之相反,circ-ITCH 的显著下调与 TNBC 的不良预后有关, circ-ITCH 可以结合 miR-214 和 miR-17 并增加 ITCH 的表达,从而灭活 Wnt/ β -catenin 信号,抑制 TNBC 的增殖^[13]。

低氧是乳腺肿瘤微环境的主要特征之一。低氧可通过 circRNA-miRNA-mRNA 轴调控乳腺癌细胞分化、增殖及转移。CircDENND4C 可竞争性结合 miR-200b 和 miR-200c,而下调 circDENND4C 的表达可通过促进 miR-200b 和 miR-200c 的表达进而抑制乳腺癌细胞的糖酵解、转移和侵袭能力^[14]。低氧微环境会诱导乳腺癌细胞中 HIF1 α 相关的 circDENND4C 表达,而敲除 circDENND4C 基因,可以抑制低氧环境下乳腺癌细胞的增殖和转移^[15]。

4.2 CircRNA 调控乳腺癌 (BC) 细胞转移

上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是乳腺癌细胞获得侵袭能力的重要途径,指上皮细胞失去细胞极性以及与基底膜间的连接,进而获得高转移、抗凋亡和可降解细胞外基质等特性。CircANKS1B 通过竞争性结合 miR-148a-3p 和 miR-152-3p 来增加转录因子 USF1 的表达,进而

激活 TGF- β 1/Smad 信号、促进 EMT,最终促进了 TNBC 的侵袭转移^[16]。Hsa_circ_001569 基因表达下调可减少 PI3K/AKT 通路激活和抑制 EMT 效应,并因此抑制乳腺癌细胞的增殖和转移^[17]。Circ-TFF1 和 TFF1 在 BC 中均过表达且呈正相关。Circ-TFF1 在体外可促进 BC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT,在体内可通过海绵化 miR-326 增加 TFF1 表达,促进 BC 细胞增殖^[18]。CircRNA-miRNA-mRNA 轴可能在乳腺癌转移癌的治疗中发挥重要作用。Hsa_circ_21439 和 hsa_circ_11783 分别是肝转移癌组织细胞中表达上调和下调最显著的 circRNA,且这两种 circRNA 可以作为 ceRNA 发挥作用,可能是乳腺癌肝转移潜在的治疗靶点^[19]。

4.3 CircRNA 调控乳腺癌 (BC) 化疗耐药

乳腺癌耐药特征是影响乳腺癌治疗的重要因素之一。阿霉素、他莫西芬、单星素已被广泛应用于乳腺癌患者的化学药物治疗 (简称化疗),circRNA 主要参与了这 3 种化疗药物的耐药作用。

阿霉素是一种抑制 DNA 和 RNA 合成的临床用广谱抗肿瘤药物。CircKDM4C 可竞争性结合 miR-548p,而上调 miR-548p 的表达可逆转 circKDM4C 诱导的乳腺癌细胞恶性表型减弱和 PBLD 的表达升高^[20]。CircKDM4C 在体内外均可显著抑制乳腺癌的增殖

和转移,并减缓乳腺癌患者对阿霉素的耐药。与阿霉素敏感组相比,hsa_circ_0006528 在阿霉素耐药细胞系和组织中表达水平更高。相关机制可能为 hsa_circ_0006528 竞争性结合 miR-7-5p,从而抑制 Raf1 相关 MAPK 信号通路,促进乳腺癌阿霉素耐药的发生^[21]。

他莫昔芬是一种主要用于雌激素受体阳性乳腺癌患者的非甾体类药物。CircBMMP2 在人乳腺癌组织中表达显著下调,同时 circBMMP2 的下调可抑制他莫昔芬诱导的细胞凋亡,促进乳腺癌细胞对他莫昔芬的耐药^[22]。Hsa_circ_0025202 在乳腺癌组织中表达明显降低,其可通过竞争性结合 miR-182-5p 来调控 FOXO3a 的表达和活性,抑制肿瘤细胞增殖和转移,增加乳腺癌细胞凋亡和他莫昔芬的敏感性^[23]。此外,上调 circRNA CDR1-AS 的表达,可通过抑制 hsa-miR-7 功能,减少了他莫昔芬治疗乳腺癌的不良反应,增强乳腺癌复发患者疗效^[24]。

单星素是一类作用于有丝分裂纺锤体的乳腺癌化疗药物,能通过抑制有丝分裂驱动蛋白 Eg5 活性发挥肿瘤抑制作用。CircRNA-MTO1 在单星素耐药

细胞中表达水平升高,此外 circRNA-MTO1 可通过结合 TRAF4,并抑制 TRAF4 所激活的 Eg5 翻译从而抑制 Eg5 蛋白水平,证实 circRNA-MTO1 的调控机制可影响乳腺癌细胞生存力和单星素耐药性^[25]。

5 问题与展望

作为新兴的调控分子,circRNA 参与了乳腺癌的增殖、侵袭、转移和化疗耐药。CircRNA 主要通过 ceRNA 机制调控乳腺癌相关基因的表达,从而发挥致癌或抑癌作用。然而,关于 circRNA 的研究还处于方兴未艾阶段,仍有许多问题有待探索,如 circRNA 命名缺乏统一标准,以及 circRNA 乳腺癌中的功能和机制的研究还比较少;而且,阐明乳腺癌中 circRNA 的生物发生、降解、细胞定位和作用机制仍然至关重要;此外,circRNA 对乳腺癌治疗主要聚焦于化疗药物耐药特性,而 circRNA 对其他免疫治疗、放射治疗等抵抗作用还知之甚少,也需要格外的关注。深入了解 circRNA 在乳腺癌中的作用机制和耐药影响,将促进乳腺癌治疗策略的开发,以及有益于乳腺癌相关的早期筛查、精准诊断和预后监测等诸多领域。

参考文献:

- [1] 郑亚男,李梅,赵基源. 乳腺癌骨转移分子机制及靶向药物的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2021, 41: 433-437.
- [2] Narrandes S, Huang SJ, Murphy L, *et al.* The exploration of contrasting pathways in triple negative breast cancer (TNBC)[J]. BMC Cancer, 2018, 18:22. doi: 10.1186/s12885-017-3939-4.
- [3] Hu Q, Zhou T. EIciRNA-mediated gene expression: tunability and bimodality [J]. FEBS Lett, 2018, 592: 3460-3471.
- [4] Zhang CL, Wu H, Wang YH, *et al.* Expression patterns of circular RNAs from primary kinase transcripts in the mammary glands of lactating rats [J]. J Breast Cancer, 2015, 18:235-241.
- [5] Pagliarini V, Jolly A, Bielli P, *et al.* Sam68 binds Alu-rich introns in SMN and promotes pre-mRNA circularization[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48:633-645.
- [6] Venø MT, Hansen TB, Venø ST, *et al.* Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development[J]. Genome Biol, 2015, 16: 245. doi: 10.1186/s13059-015-0801-3.
- [7] Li Z, Huang C, Bao C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22:256-264.
- [8] Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Anderson GD. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. Nat Commun, 2018, 9:2629. doi: 10.1038/s41467-018-05096-6.
- [9] 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, 24:323-331.
- [10] Kong Y, Yang L, Wei W, *et al.* CircPLK1 sponges miR-296-5p to facilitate triple-negative breast cancer pro-

- gression[J]. *Epigenomics*, 2019, 11:1163-1176.
- [11] Yang R, Xing L, Zheng X, *et al.* The circRNA circACFG1 acts as a sponge of miR-195-5p to promote triple-negative breast cancer progression through regulating CCNE1 expression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18:4. doi: 10.1186/s12943-018-0933-7.
- [12] Zhang J, Xu HD, Xing XJ, *et al.* CircRNA-069718 promotes cell proliferation and invasion in triple-negative breast cancer by activating Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23:5315-5322.
- [13] Wang ST, Liu LB, Li XM, *et al.* Circ-ITCH regulates triple-negative breast cancer progression through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Neoplasma*, 2019, 66:232-239.
- [14] Ren S, Liu J, Feng Y, *et al.* Knockdown of circDENND4C inhibits glycolysis, migration and invasion by up-regulating miR-200b/c in breast cancer under hypoxia[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38:388. doi: 10.1186/s13046-019-1398-2.
- [15] Liang G, Liu Z, Tan L, *et al.* HIF1 α -associated circdennd4c promotes proliferation of breast cancer cells in hypoxic environment [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37:4337-4343.
- [16] Zeng K, He B, Yang BB, *et al.* The pro-metastasis effect of circANKS1B in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17:160. doi: 10.1186/s12943-018-0914-x.
- [17] Xu JH, Wang Y, Xu D. Hsa-circ-001569 is an unfavorable prognostic factor and promotes cell proliferation and metastasis by modulating PI3K-AKT pathway in breast cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2019, 25:193-201.
- [18] Pan G, Mao A, Liu J, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0061825 (circ-TFF1) contributes to breast cancer progression through targeting miR-326/TFF1 signalling[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53:1-14.
- [19] Lin X, Hong S, Chen J, *et al.* The potential targets for metastases: a study on altered circular RNA profile in breast cancer liver metastases [J]. *Epigenomics*, 2019, 11:1237-1250.
- [20] Liang Y, Song X, Li Y, *et al.* CircKDM4C suppresses tumor progression and attenuates doxorubicin resistance by regulating miR-548p/PBLD axis in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2019, 38:6850-6866.
- [21] Gao D, Zhang X, Liu B, *et al.* Screening circular RNA related to chemotherapeutic resistance in breast cancer [J]. *Epigenomics*, 2017, 9:1175-1188.
- [22] Liang Y, Song X, Li Y, *et al.* Targeting the circBMPR2/miR-553/USP4 axis as a potent therapeutic approach for breast cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17:347-361.
- [23] Sang Y, Chen B, Song X, *et al.* CircRNA_0025202 regulates tamoxifen sensitivity and tumor progression via regulating the miR-182-5p/FOXO3a axis in breast cancer[J]. *Mol Ther*, 2019, 27:1638-1652.
- [24] Uhr K, Sieuwerts AM, de Weerd V, *et al.* Association of microRNA-7 and its binding partner CDR1-AS with the prognosis and prediction of 1st-line tamoxifen therapy in breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8:9657. doi: 10.1038/s41598-018-27987-w.
- [25] Liu Y, Dong Y, Zhao L, *et al.* Circular RNA-MTO1 suppresses breast cancer cell viability and reverses monastrol resistance through regulating the TRAF4/Eg5 axis[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53:1752-1762.