

分类号: R737.9

密 级: 公开

单位代码: 10422

学 号: 202115636



山东大学
SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: CircSCAP 调控激素受体阳性乳腺癌进展转移的机制研究

The function and mechanism of circSCAP in hormone receptor-positive breast cancer

作者姓名	刘怡伟
培养单位	第一临床学院
专业名称	外科学 (普外科学)
指导教师	杨其峰 教授
合作导师	

2024 年 5 月 29 日

分类号: R737.9
密 级: 公开

单位代码: 10422
学 号: 202115636



山东大学
SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: CircSCAP 调控激素受体阳性乳腺癌进展转
移的机制研究

The function and mechanism of circSCAP in hormone
receptor-positive breast cancer

作者姓名	刘怡伟
培养单位	第一临床学院
专业名称	外科学(普外科学)
指导教师	杨其峰 教授
合作导师	

2024年5月29日

摘 要

研究背景

乳腺癌已成为世界上发病率最高的恶性肿瘤类型之一。作为一种激素依赖性肿瘤，乳腺癌被分为 Luminal A、Luminal B、HER2 过表达型和 Basal-like 4 种亚型。激素受体阳性乳腺癌被定义为表达 ER 或 PR 的亚型，包括 Luminal A 和 Luminal B，约占浸润性乳腺癌的 70%，是占比最大的乳腺癌亚型。因此，探索激素受体阳性乳腺癌增殖和进展的分子机制至关重要，对于乳腺癌的精准诊断和治疗具有指导性价值。

代谢重编程是癌细胞特征性地改变代谢途径以促进细胞进展并维持其恶性特征的过程，已成为癌细胞的标志之一。越来越多的证据表明，脂肪酸代谢重编程参与了癌细胞的生长、转移和分化，是癌症治疗的一个新的重要靶点。脂滴（Lipid droplet, LD）是一种独特的脂质储存细胞器，被来源于内质网膜的单层磷脂包围。作为一种动态的功能性细胞器，脂滴的积累可以通过稳定癌症干细胞（Cancer stem cell, CSC）的特性来促进乳腺癌的增殖和侵袭潜力。然而，脂质代谢重编程在激素受体阳性乳腺癌进展中的具体机制仍有待进一步研究。

环状 RNA（Circular RNA, circRNA）是一类具有共价闭合环状结构的单链非编码 RNA。不同于线性 RNA 的经典结构，环状 RNA 通过反向剪接产生，不具有 5'端的帽子，3'端的 poly A 尾，因此表现出更高的稳定性。研究发现，环状 RNA 与癌症的进展密切相关，并通过多种功能途径参与脂肪酸代谢重编程。然而，环状 RNA 对乳腺癌的脂肪酸代谢重编程和进展转移的影响知之甚少。

为了寻找与激素受体阳性乳腺癌密切相关的 circRNA，我们联合高通量测序及生物信息学方法，鉴定出在激素受体阳性乳腺癌中显著上调的 circSCAP，并通过临床样本预后分析和体外实验深入研究 circSCAP 的功能及分子作用机制。

第一部分 激素受体阳性乳腺癌相关 circRNA 的筛选及表达分析研究

研究目的

- 1.筛选与激素受体阳性乳腺癌相关的 circRNA;
- 2.检测乳腺癌组织及细胞系中 circSCAP 的表达水平并分析其与激素受体阳性乳腺癌患者临床特征及预后的相关性。

研究方法

联合高通量测序技术及生物信息学分析从 GEO 数据库中筛选与乳腺癌密切相关的环状 RNA 候选分子。通过 RT-qPCR 技术筛选最适合研究的目标 circRNA。随后,在乳腺癌各细胞系及乳腺癌患者的肿瘤组织和正常组织中,检测 circSCAP 的表达水平。最后,利用统计学方法分析 circSCAP 的表达水平与激素受体阳性乳腺癌患者临床病理学特征及预后之间的关联。

研究结果

与其他乳腺癌亚型的组织和细胞相比, circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌组织和细胞系中表达明显上调。进一步的分析表明, circSCAP 的表达水平与激素受体阳性乳腺癌的不良临床结局密切相关, circSCAP 是着激素受体阳性乳腺癌预后的独立预后预测因子。

研究结论

- 1.CircSCAP 在激素受体阳性乳腺癌组织和细胞系中显著高表达;
- 2.CircSCAP 的表达水平与激素受体阳性乳腺癌患者的预后密切相关。

关键词: 激素受体阳性乳腺癌; circSCAP; 预后

第二部分 CircSCAP 环状特性及亚细胞定位的研究

研究目的

- 1.检测 circSCAP 是否具有 circRNA 典型的环状结构特性;
- 2.探究 circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌细胞的亚细胞定位及作用潜能。

研究方法

通过查询 circBase 数据库确定 circSCAP 的基因组来源。为了确认 circSCAP 在激素受体阳性的乳腺癌细胞中的存在,采用 PCR 技术,并辅以琼脂糖凝胶电泳进行可视化验证。为探究 circSCAP 的环状结构稳定性,利用 RNase R 消化实验和放线菌素 D 处理实验。此外,利用 RNA 荧光原位杂交和细胞核质分离技术,对 circSCAP 在细胞内的亚细胞定位进一步研究。

研究结果

CircSCAP 是由 SCAP 基因的第 3 至第 8 外显子转录后经反向剪接环化而形成的环状 RNA 分子,其长度为 918nt。我们识别并扩增了 circSCAP 的反向剪接位点证明其在激素受体阳性的乳腺癌细胞中存在。同时不同于线性 RNA, circSCAP 表现出对 RNase R 酶的抗性,并且具有显著的稳定性,其半衰期更长,证实它的环状结构。CircSCAP 主要位于激素受体阳性乳腺癌细胞的细胞核内,预测将在此发挥潜在作用。

研究结论

- 1.CircSCAP 具有 circRNA 的基本环状稳定特性;
- 2.CircSCAP 主要在细胞核中发挥作用。

关键词: 激素受体阳性乳腺癌; circSCAP; 亚细胞定位

第三部分 CircSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌进展转移的功能研究

研究目的

- 1.探究 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞生长增殖、迁移侵袭能力的影响;
- 2.探究 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌干性特征的影响。

研究方法

干扰或者过表达 circSCAP 后利用 MTT、克隆形成、EdU 等体外功能实验探究对激素受体阳性乳腺癌细胞生长增殖能力的影响;同时,利用 Transwell 系统以及划痕实验探究干扰或者过表达 circSCAP 后,激素受体阳性乳腺癌细胞迁移及侵袭能力的改变。随后,干扰或者过表达 circSCAP 后利用干细胞成球实验和患者来源的乳腺癌类器官模型探究 circSCAP 影响激素受体阳性乳腺癌干性特征的能力。

研究结果

在体外功能分析中,干扰 circSCAP 能显著抑制激素受体阳性乳腺癌细胞的生长增殖、迁移侵袭行为,同时降低其干性自我更新的能力;而过表达 circSCAP 可以促进激素受体阳性乳腺癌细胞的生长增殖、迁移侵袭行为和干性特性。

研究结论

- 1.CircSCAP 显著增强激素受体阳性乳腺癌细胞生长增殖、迁移侵袭能力;
- 2.CircSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌细胞干性特征。

关键词: 激素受体阳性乳腺癌; circSCAP; 生长增殖; 迁移; 干性

第四部分 CircSCAP 促进脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌恶性进展的功能研究

研究目的

- 1.探究 circSCAP 对脂肪酸从头合成的影响;
- 2.探究 circSCAP 对脂肪酸存储的影响;
- 3.探究 circSCAP 对脂肪酸氧化分解的影响;
- 4.探究 circSCAP 是否通过影响脂肪酸代谢重编程改变激素受体阳性乳腺癌干性特征;
- 5.探究 circSCAP 是否通过影响脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌进展转移。

研究方法

利用 Western blot、油红 O 染色、Bodipy 493/503 荧光染色和脂肪酸氧化速率比色法检测等实验技术探究干扰或者过表达 circSCAP 后对脂肪酸代谢从头合成、存储、氧化分解等途径的影响。通过抑制剂 C75 抑制脂肪酸代谢,设计体外功能试验的 Rescue 实验分析对激素受体阳性乳腺癌干性特征及进展转移等恶性特征的影响。

研究结果

干扰 circSCAP 能抑制脂肪酸代谢从头合成和存储脂滴的形成,促进氧化分解的利用,过表达则展现相反的效果。在过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75,能够缓解由于 circSCAP 异常表达带来的脂肪酸代谢的增强,进而减少激素受体阳性乳腺癌的干性自我更新、增殖转移等恶性进展。

研究结论

- 1.CircSCAP 促进脂肪酸从头合成途径;
- 2.CircSCAP 促进脂肪酸存储途径;
- 3.CircSCAP 抑制脂肪酸氧化分解途径;
- 4.CircSCAP 通过促进脂肪酸代谢重编程促进激素受体阳性乳腺癌干性特征;
- 5.CircSCAP 通过促进脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌进展转移等恶性进展。

关键词: 激素受体阳性乳腺癌; circSCAP; 脂肪酸代谢重编程; C75; 干性

第五部分 CircSCAP 调控 SCD1 介导的脂肪酸代谢影响激素受体阳性 乳腺癌恶性进展的分子机制

研究目的

1. 筛选 circSCAP 的下游作用靶点；
2. 探究 circSCAP 对 SCD1 的影响及分子作用机制；
3. 阐明 circSCAP 通过影响 SCD1 调控脂肪酸代谢重编程的功能；
4. 阐明 circSCAP 通过影响 SCD1 调控激素受体阳性乳腺癌细胞恶性进展的功能。

研究方法

利用 RNA pull-down 及蛋白质谱分析技术，筛选 circSCAP 的下游功能靶点，利用转录因子数据库预测及双荧光素酶报告基因实验进一步验证 circSCAP 与转录因子 RXRA 及下游靶基因 SCD1 的互作关系。设计 Rescue 实验，通过油红 O 染色、Bodipy 493/503 荧光染色、Western blot 实验及脂肪酸氧化速率比色法检测下游脂肪酸代谢各途径的变化。利用干细胞成球和患者来源的乳腺癌类器官模型检测下游 SCD1 对 circSCAP 促进干性自我更新中的影响，利用 MTT、克隆形成和 EdU 实验检测下游 SCD1 在 circSCAP 促进增殖功能中的影响，利用 Transwell 系统和划痕实验检测下游 SCD1 在 circSCAP 促进迁移侵袭功能中的影响。

研究结果

利用 RT-qPCR 和 Western blot 实验，我们发现 circSCAP 能够调控脂肪酸代谢通路关键酶 SCD1 的表达，作为其功能作用靶点。随后利用 RNA pull-down 及蛋白质谱分析技术，我们筛选了 circSCAP 可能相互结合作用的下游蛋白谱，通过数据库预测 SCD1 的转录因子集与蛋白谱取交集，我们发现 circSCAP 可能与 RXRA 相互结合调控 SCD1。

进一步利用双荧光素酶报告基因验证 circSCAP 与 RXRA 结合后调控下游靶基因 SCD1 的表达。最后，通过设计功能试验的 Rescue 实验，我们发现过表达 SCD1 能逆转干扰 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌进展转移的效果，而敲低 SCD1 能减弱过表达 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌进展转移的促进效果。

研究结论

1. SCD1 是 circSCAP 下游的功能作用靶点；

2.CircSCAP 通过调控转录因子 RXRA 提高功能靶点 SCD1 的表达以作用于脂肪酸代谢重编程;

2.CircSCAP 通过调节 SCD1 介导的脂肪酸代谢重编程促进激素受体阳性乳腺癌进展转移的分子机制。

关键词: 激素受体阳性乳腺癌; circSCAP; RXRA; SCD1; 脂肪酸代谢重编程

ABSTRACT

Background

According to the latest data, breast cancer has become one of the most malignant cancer types with the highest incidence rate in the world. Breast cancer is a hormone-dependent tumor and is divided into four intrinsic molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, and Basal-like according to the varying expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Hormone receptor-positive breast cancer, which includes Luminal A and Luminal B, is defined as a subtype that expresses ER and PR. It accounts for approximately 70% of invasive breast cancers, making it the most prevalent breast cancer classification. Therefore, it is crucial to explore the molecular mechanisms involved in the proliferation and progression of hormone receptor-positive breast cancer. Additionally, finding more valuable coping strategies and developing precisely targeted therapies are urgent challenges.

Cancer cells exhibit distinctive alterations in metabolic pathways, orchestrating cellular processes and sustaining malignant traits—a phenomenon commonly referred to as metabolic reprogramming, which stands as a hallmark of cancer cells. Increasing evidence shows that fatty acid (FA) metabolism reprogramming engaged in the progression, metastasis, and stemness of cancer cells. Lipid droplets (LDs) are uniquely lipid-storing cytoplasmic organelles, surrounded by a monolayer of phospholipids derived from the membrane of the endoplasmic reticulum. As a dynamic and functional organelle, the accumulation of LDs was discovered to facilitate the proliferative and invasive potential of breast cancer by stabilizing the properties of cancer stem cells (CSCs). Nevertheless, the mechanisms of fatty acid metabolic reprogramming in the progression of hormone receptor-positive breast cancer remain to be further studied. Circular RNAs (circRNAs) are a class of non-coding RNAs with single-stranded, covalently closed circular structures. Produced by back splicing, circRNAs do not contain the classic 5'–3' pattern of linear RNAs, such as cap at the 5' ends, poly A tail at the 3' ends. Thus, they are stabler than linear RNAs and not easily degraded by RNA exonuclease or Ribonuclease R (RNase R). Mounting studies have shown that circRNAs are closely associated with the progression of cancers and are involved in fatty acid metabolism or stemness personality by multiple functional pathways. However, little is known about the effects of circRNAs on both fatty acid metabolism and stemness characteristics of hormone

receptor-positive breast cancer.

In our present study, we identified a novel circRNA, circSCAP (hsa_circ_0065214) that was upregulated in hormone receptor-positive breast cancer and demonstrated a positive correlation with a poor prognosis. Then we used clinical samples and in vitro experiments to conduct further exploration on the function and molecular mechanism of circSCAP.

Chapter I Screening and expression analysis of circRNAs related to hormone receptor-positive breast cancer

Objective

1. Screen circRNA associated with hormone receptor-positive breast cancer;
2. Detect the expression level of circSCAP in breast cancer tissues and cell lines and explore its correlation with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients with hormone receptor-positive breast cancer.

Methods

We combined high-throughput sequencing technology and bioinformatics analysis to screen circRNA closely related to hormone receptor-positive breast cancer from the GEO databases. And RT-qPCR analysis was used to screen the most suitable target circRNA for research. Subsequently, the expression levels of circSCAP were detected in various breast cancer cell lines and tumor tissues. Finally, statistical methods were used to analyze the correlation between the expression level of circSCAP and the clinicopathological characteristics and prognosis in patients with hormone receptor-positive breast cancer.

Results

Compared with tissues and cells of other breast cancer subtypes, the expression of circSCAP was significantly upregulated in hormone receptor-positive breast cancer tissues and cell lines. Further analysis showed that the expression level of circSCAP was closely related to the adverse clinical outcomes of hormone receptor-positive breast cancer, and circSCAP was an independent prognostic predictor of the hormone receptor-positive breast cancer.

Conclusion

1. CircSCAP was significantly highly expressed in hormone receptor-positive breast cancer tissues and cell lines;
2. The expression level of CircSCAP was closely related to prognosis of hormone receptor-positive breast cancer patients.

Key words: hormone receptor-positive breast cancer; circSCAP; prognosis

Chapter II Study on circular characteristics and subcellular localization of circSCAP

Objective

1. Verify whether circSCAP has the typical circular characteristics of circRNA;
2. Detect the subcellular localization and potential function of circSCAP.

Methods

The circBase database was used to analyze the genomic origin of circSCAP. PCR, agarose gel electrophoresis and other methods were used to verify the presence of circSCAP in hormone receptor-positive breast cancer. RNase R, actinomycin D and other stability experiments were used to test the cyclic characteristic of circSCAP. RNA-FISH and nucleocytoplasmic separation experiments were used to explore the cellular sub-localization of circSCAP.

Results

CircSCAP was transcribed and back-spliced from exons 3-8 of the SCAP gene with 918 nt in length. The specific splice junction of circSCAP could be amplified only using divergent primers. And, unlike linear RNA, circSCAP had the stable characteristics in resisting RNase R digestion and longer half-life, indicating that circSCAP was a circular RNA. CircSCAP was mainly located in the nucleus of hormone receptor-positive breast cancer cells, and which predicted to play a potential role here.

Conclusion

1. CircSCAP had the basic circular properties of circRNA;
2. CircSCAP mainly functioned in the nucleus.

Key words: hormone receptor-positive breast cancer; circSCAP; subcellular localization

Chapter III CircSCAP promotes the progression of hormone receptor-positive breast cancer

Objective

1. Explore the effect of circSCAP on the proliferation, migration and invasion in hormone receptor-positive breast cancer cells;
2. Investigate the ability of circSCAP to promote the stemness characteristics of hormone receptor-positive breast cancer.

Methods

After interfering or overexpressing circSCAP, functional experiments in vitro, such as MTT, colony formation, EdU and others were used to explore the effect on the growth and proliferation of hormone receptor-positive breast cancer cells. Similarly, after interfering or overexpressing circSCAP, the Transwell system and wound healing experiments were carried out to explore the effect of circSCAP on the migration and invasion ability of hormone receptor-positive breast cancer cells. Subsequently, tumor sphere formation assay and patient-derived breast cancer organoid models were used to explore the ability of circSCAP to affect the stemness characteristics of hormone receptor-positive breast cancer.

Results

We found that circSCAP silence could significantly inhibit the proliferation, migration, invasion and stemness self-renewal characteristics of hormone receptor-positive breast cancer, while, overexpressing circSCAP could promote hormone receptor inversely.

Conclusion

1. CircSCAP significantly promoted the proliferation, migration, and invasion of hormone receptor-positive breast cancer cells;
2. CircSCAP accelerated self-renewal of cancer stemness in hormone receptor-positive breast cancer.

Key words: hormone receptor-positive breast cancer; circSCAP; progression; metastasis stemness

Chapter IV CircSCAP promotes fatty acid metabolism reprogramming and affects the malignant progression of hormone receptor-positive breast cancer

Objective

1. Explore the effect of circSCAP on fatty acids synthesis;
2. Explore the effect of circSCAP on fatty acid storage;
3. Explore the effect of circSCAP on the fatty acid oxidation;
4. Explore whether circSCAP affects stemness of hormone receptor-positive breast cancer by affecting fatty acid metabolism reprogramming;
5. Explore whether circSCAP affects the progression of hormone receptor-positive breast cancer by affecting fatty acid metabolism reprogramming.

Methods

Experimental techniques such as Western blot, Oil Red O staining, Bodipy 493/503 staining, and fatty acid oxidation rate colorimetric detection were used to explore the effects of circSCAP on de novo synthesis, storage, oxidative decomposition, and other pathways of fatty acid metabolism after interference or overexpression of circSCAP. Inhibiting fatty acid metabolism by the inhibitor C75, the Rescue experiments were designed to analyze the impact on malignant characteristics such as stemness characteristics and progression of hormone receptor-positive breast cancer by fatty acid metabolism reprogramming.

Results

Silencing circSCAP could inhibit the de novo synthesis and the formation of storage lipid droplets of fatty acid metabolism but promote the oxidative decomposition, while overexpression circSCAP showed the opposite effect. Adding the inhibitor C75 after overexpressing circSCAP could alleviate the enhancement of fatty acid metabolism caused by abnormal expression of circSCAP, thereby reducing the malignant progression of proliferation, metastasis, and stem self-renewal of hormone receptor-positive breast cancer.

Conclusion

1. CircSCAP promoted de novo synthesis of fatty acids;
2. CircSCAP increased lipid drops in fatty acid storage;

3.CircSCAP inhibited the oxidative decomposition of fatty acids;

4.CircSCAP promoted the stemness of hormone receptor-positive breast cancer by promoting fatty acid metabolic reprogramming;

5.CircSCAP affected the malignant progression of hormone receptor-positive breast cancer by promoting fatty acid metabolic reprogramming.

Key words: hormone receptor-positive breast cancer; circSCAP; fatty acid metabolic reprogramming; C75; stemness

Chapter V The molecular mechanism of circSCAP in promoting progression of hormone receptor-positive breast cancer via SCD1-mediated fatty acid metabolism

Objective

- 1.Screen the downstream target of circSCAP;
- 2.Explore the effect of circSCAP on SCD1 and specific molecular mechanism;
- 3.Demonstrate the regulation of circSCAP for fatty acid metabolic reprogramming by influencing SCD1.
- 4.Elucidate the function of circSCAP in regulating the malignant progression of hormone receptor-positive breast cancer cells via SCD1-mediated fatty acid metabolism.

Methods

The downstream functional targets of circSCAP were screened by RNA pull-down and protein profiling techniques, and the interaction was further verified by transcription factor database prediction and Dual-luciferase reporter assay. Rescue experiments were designed to detect the effect of SCD1 on fatty acid metabolic reprogramming of hormone-receptor-positive breast cancer by Western blot, Oil Red O staining, Bodipy 493/503 staining, and fatty acid oxidation rate colorimetric detection. Rescue experiments were designed to detect the effect of SCD1 on the progression of hormone-receptor-positive breast cancer by MTT, Clone formation assay, EdU, the Transwell system, wound healing assay.

Results

We found that circSCAP could regulate the expression of SCD1 as its functional target. Then,we screened the downstream protein profiles which circSCAP might interact with. By Venn diagram of the transcription factor subsets of SCD1 and the protein profile, we found that circSCAP might interact with RXRA to regulate SCD1 expression.

Dual-luciferase reporter assay was further used to verify that circSCAP combined with RXRA and regulated the expression of downstream SCD1. Finally, through Rescue experiments, we found that overexpression of SCD1 could reverse the effect of interfering with circSCAP on the progression of hormone-receptor-positive breast cancer, while knockdown of SCD1 could weaken the promoting effect of circSCAP overexpression on the progression of hormone-receptor-positive breast cancer.

Conclusion

- 1.SCD1 was the downstream functional target of circSCAP ;
- 2.CircSCAP regulated the functional target SCD1 expression by increasing and binding to transcription factor RXRA;
- 3.CircSCAP promoted the proliferation and metastasis of hormone receptor-positive breast cancer by SCD1-mediated fatty acid metabolic reprogramming.

Key words: hormone receptor-positive breast cancer; circSCAP; fatty acid metabolic reprogramming; RXRA; SCD1

目 录

绪论.....	1
第一部分 激素受体阳性乳腺癌相关 circRNA 的筛选及表达分析研究	7
研究目的.....	7
材料与方法.....	7
研究结果.....	12
第二部分 CircSCAP 环状特性及亚细胞定位的研究	17
研究目的.....	17
材料与方法.....	17
研究结果.....	22
第三部分 CircSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌恶性进展的功能研究	26
研究目的.....	26
材料与方法.....	26
研究结果.....	38
第四部分 CircSCAP 促进脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺 癌恶性进展的功能研究.....	43
研究目的.....	43
材料与方法.....	43
研究结果.....	47
第五部分 CircSCAP 调控 SCD1 介导的脂肪酸代谢影响激素受体阳性 乳腺癌恶性进展的分子机制	53
研究目的.....	53
材料与方法.....	53
研究结果.....	62
讨论.....	70
结论.....	73
参考文献.....	74
学位论文中涉及的 Western 原始数据	78

符号说明

缩略语	英文名称	中文名称
3DW	Triply distilled water	三蒸水
ACCA	Acetyl-CoA carboxylase alpha	乙酰辅酶 A 羧化酶 α 亚基
ACLY	ATP citrate lyase	ATP 柠檬酸裂解酶
Acr-Bis	Acrylamide-Bisacrylamide	丙烯酰胺-甲叉丙烯酰胺
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
ATCC	American Type Culture Collection	美国模式培养物集存库
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
ceRNA	Competing endogenous RNA	竞争性内源性 RNA
CircRNA	Circular RNA	环状 RNA
CPT1	Carnitine Palmitoyl Transferase 1	肌酰基转移酶 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ECL	Enhanced chemiluminescence	化学发光增强
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
FA	Fatty Acid	脂肪酸
FAO	Fatty acid oxidation	脂肪酸氧化
FASN	Fatty acid synthase	脂肪酸合酶
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
gDNA	Genomic DNA	基因组 DNA
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	人类表皮生长因子受体 2
IARC	International Agency for Research on Cancer	国际癌症研究中心
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
LD	Lipid droplet	脂滴
miRNA	MicroRNA	微小核糖核酸
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium	噻唑蓝
OD	Optical density	吸光度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PDO	Patients derived organoids	患者来源的类器官
PLIN	Perilipin	围脂滴蛋白
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RBP	RNA-binding protein	RNA 结合蛋白
RNase R	Ribonuclease R	核糖核酸酶 R

RT-qPCR	Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction	实时定量逆转录聚合酶链反应
RXRA	Retinoid X receptor alpha	视黄酸 X 受体 α
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase 1	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1
SDS	Sodium dodecylsulfate	十二烷基硫酸钠
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
TEMED	N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺

绪论

1.1 激素受体阳性乳腺癌研究概况

乳腺癌已跃居女性恶性肿瘤发病率首位，同时也是造成女性死亡的主要癌症类型之一。根据世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）发布的全球最新癌症负担数据，全球范围 2022 年有 230 万例新发乳腺癌病例和 67 万例癌症死亡病例，乳腺癌在女性癌症发病率和死亡率的首要原因上居高不下，严重威胁女性身体健康和心理状态^[1]。与此同时，来自中国疾病预防控制中心的研究团队基于超 3 亿中国人数据，总结了 2005-2020 年全国癌症负担趋势，乳腺癌取代结肠癌和直肠癌上升为女性癌症相关死亡的第五大原因，尤其是在 20-39 岁年龄组的女性中，乳腺癌的排名从第三位上升到第一位^[2]。中国乳腺癌发病率与世界平均水平相近，低于高收入国家；然而，死亡人数远高于全球平均水平以及高收入国家，且呈现逐年增加趋势，这不仅仅与中国庞大的人口基数有关，也凸显了我国正面临日益增长的乳腺癌疾病负担，乳腺癌的防控局面显得尤为严峻。

乳腺癌是一种与激素水平密切相关的恶性肿瘤，其生物学行为和治疗效果因分子亚型的不同而有显著差异。临床上通过免疫组化检测（Immunohistochemistry, IHC）检测肿瘤组织中的激素受体表达和细胞分子状态，包括雌激素受体（Estrogen Receptor, ER）、孕激素受体（Progesterone Receptor, PR）以及人类表皮生长因子受体 2（Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2），以此将乳腺癌分为四种内在分子亚型：Luminal A、Luminal B、HER2 过表达型和三阴性（Basal-like 型）^[3]。激素受体阳性乳腺癌表现出 ER 和 PR 基因的高水平表达，并可根据这些基因表达特征被分为 Luminal A 型和 Luminal B 型。Luminal A 型乳腺癌不表达 HER2，且 Ki-67 增殖抗原指数较低，其病理分级多为 Scarff-Bloom-Richardson 的 1 级或 2 级。而 PR 的低表达是 Luminal B 型的一个特征。Luminal B 型乳腺癌中细胞增殖和细胞周期调控相关的基因或蛋白质表达水平较高，Ki-67 增殖指数也较高，是预后不良的一个指标^[4]。Luminal A 型和 Luminal B 型的激素受体阳性乳腺癌占有浸润性乳腺癌的大约 70%，是临床中最常见的一种类型，也是临床治疗中面对最多的挑战来源^[5]。探讨激素受体阳性乳腺癌增殖和侵袭的分子机制至关重要。

目前，激素受体阳性乳腺癌的治疗主要包括内分泌治疗、手术治疗、化疗及放疗等方法^[6]。内分泌治疗是最主要的治疗方式，利用药物阻断激素对癌细胞的促进作用，常用的药物有雌激素受体调节剂他莫昔芬、芳香化酶抑制剂来曲唑、雌激素受体下调剂氟维司群等^[7, 8]。内分泌治疗的决策通常基于患者的年龄、肿瘤特征、激素受体和 HER2 状态等因素。尽管 Luminal A 型乳腺癌临床上预后较好，但长期的内分泌治疗药物压制，

复发风险和远处转移存在长期性，可能持续 10-15 年，给后期临床和复查带来巨大挑战^[9]。Luminal B 型通常包括较高的细胞增殖指数，增长速度加快的同时复发风险也显著提高，对传统的内分泌治疗也存在越来越明显的抵抗作用，传统的治疗方法越来越力不从心^[10]。随着精准医疗的发展，越来越多的生物标志物被用来指导治疗选择，以实现个体化治疗，尤其是靶向代谢疗法、非编码 RNA 疗法等方法的突破，将为肿瘤的治疗带来了新方向，提高患者的生存长度和生活质量^[11]。

1.2 脂肪酸代谢重编程在乳腺癌中的研究进展

代谢重编程 (Metabolic Reprogramming) 是细胞为了应对各种刺激压力而进行的一系列代谢调整的过程，包括糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等多个途径，与癌症的发生和发展密切相关^[12, 13]，已成为癌症的十大标志之一^[14]。乳腺癌细胞的脂肪酸代谢异常尤为突出，这与它们经常存在于由大量脂肪细胞构成的环境中有关，这样的环境富含脂肪酸，对乳腺癌细胞的代谢产生重要影响^[15]。许多研究证实，脂肪酸代谢对乳腺癌细胞的生长和转移将起到重要的作用。脂肪酸代谢重编程在乳腺癌的发生和发展中引起了越来越多的关注和重视。

脂肪酸 (Fatty Acid, FA) 是构成甘油三酯的主要成分，其代谢过程包括从头合成、外源性摄入、在脂滴 (Lipid droplet, LD) 中储存以及氧化分解等多个途径。因此，脂肪酸代谢途径在正常组织与乳腺肿瘤组织中重要性的差异，被认为是一个潜在的治疗靶点，探索这一途径可能为肿瘤治疗方法的突破提供线索。

乳腺癌中脂肪酸代谢重编程主要表现在以下几点：

1. 乳腺癌细胞对脂肪酸合成的需求异常

脂肪酸合成途径在乳腺癌的形成及进展过程中扮演着关键角色。主要表现在，即使在有外源脂质的情况下也会激活脂肪酸的从头合成途径^[16]。乳腺癌细胞中脂肪酸的合成主要通过一系列合成酶利用葡萄糖和氨基酸代谢产生的细胞质乙酰辅酶 A 进行，这些与脂肪酸合成相关的酶在乳腺癌中高表达，而在正常组织中表达较低或不表达。例如，在乳腺癌中研究最为充分的脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase, FASN) 具有癌基因的作用，通过各种途径上调其活性能够促进癌细胞侵袭和转移等恶性进展。此外，脂肪酸合成所需的乙酰辅酶 A 通过 ATP 柠檬酸裂解酶 (ATP citrate lyase, ACLY) 来催化产生。ACLY 的高表达和活性上调在包括乳腺癌在内的许多癌症中都被观测到，表明它在癌症代谢中起关键作用^[17, 18]。通过抑制 ACLY 的活性，如使用小干扰 RNA 或化学抑制剂 SB-204990，可以对乳腺癌细胞的增殖和转移产生负面影响^[19]。脂肪酸合成的关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase alpha, ACCA) 的表达在乳腺癌发生过程中升高，且与其恶性进展有关。尤其是，硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (Stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)

在激素受体阳性乳腺癌的转录组分析中的表达差异尤为突出。SCD1 是一种位于内质网膜上的脂肪酸去饱和酶，在脂肪酸合成过程中将饱和脂肪酸转化为单不饱和脂肪酸，在调节细胞内饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的比例方面起重要作用，在保证脂肪酸从头合成高度运转的同时进行脂肪酸的不饱和化，以存储足量的脂滴，不仅影响细胞膜结构和功能，还调节脂质代谢稳态和能量平衡^[20]。SCD1 在乳腺癌发展中也扮演重要角色。研究显示，一方面，SCD1 的过表达通过调节细胞膜特性和信号转导通路促进乳腺癌细胞的增殖和生存^[21]。另一方面，SCD1 参与调节乳腺癌细胞的能量代谢，通过促进单不饱和脂肪酸的合成维持乳腺癌细胞对脂肪酸的依赖和生长所需的能量代谢。因此，抑制 SCD1 的活性可能是克服乳腺癌耐药性、减弱癌细胞生存能力的潜在治疗策略之一，SCD1 可能是乳腺癌治疗的潜在靶点。

2. 乳腺癌细胞对外源性脂肪酸摄取异常

癌细胞除了自身合成脂肪酸，还依赖摄取食物中的脂质和周边脂肪细胞分泌的外源性脂肪酸来满足代谢和能量需求。研究表明，脂肪酸摄取的增强可能是癌细胞恶性进展和耐药的通用机制，而 CD36 则是该过程的主要受体之一。CD36 是一种清道夫受体，可以结合并内化多种底物，包括长链脂肪酸、氧化低密度脂蛋白 (LDLs) 等。临床样本中的 CD36 的高表达通常与预后不良和转移进展相关。有研究发现，癌症起始细胞的特征是其细胞膜中存在干细胞标记物 CD44 和 CD36 受体，其中 CD36 的主要功能是内化长链脂肪酸，并增强癌细胞的转移能力^[22]。分子机制上，CD36 可以促进 MYC 的核定位，并通过 GSK-3 β / β -catenin 通路激活 EMT 程序，进而维持 CD36 的正反馈循环。另一方面，在多种肿瘤模型中，通过化学药物抑制 CD36 及其通过沉默或缺失 CD36 基因，不仅可以逆转肿瘤细胞的 EMT 表型和侵袭表型，还可以阻断脂质摄取以抑制转移灶的形成。肿瘤细胞还可以增加表面其他脂质转运蛋白的表达来增加细胞内脂质利用率，如高表达 FA 转运蛋白 1 (FATP1) 或 FATP2 以及参与细胞内外脂质运输的 FA 结合蛋白，如 FABP4，从而促进肿瘤生长、转移和化疗抵抗。总之，考虑到 FA 摄取和脂质转运蛋白在癌症进展和治疗抵抗中的重要性，它们可能是有前景的治疗靶点。

3. 乳腺癌细胞中脂肪酸储存和动员的异常

乳腺癌细胞中脂肪酸的储存和动员异常是乳腺癌快速发展的重要因素之一。正常情况下，细胞脂质的存储和释放是受到严格的调控且维持平衡的状态，但乳腺癌细胞则表现出异常的脂肪酸储存和动员能力以维持高度的代谢活性和肿瘤生物学特性。一方面脂肪酸合成增加并储存于脂滴中，脂滴是位于内质网，由单层的磷脂膜围成的球形胞质细胞器，以甘油三酯和甾醇酯的形式隔离多余脂肪酸，在癌细胞进展中具有重要作用。另一方面，脂质储存的动员依赖于脂滴包被蛋白 (Perilipin, PLIN)，它属于脂滴相关蛋白家族的关键成员，通常定位在脂滴的外表面并表现出显著的磷酸化状态。这些脂滴包被蛋白在甘油三酯代谢的调控中扮演着双重角色：一方面通过防止脂肪酶与脂滴接触，

从而抑制非刺激状态下的脂质水解；另一方面，它们能够促进在激素刺激下的脂解过程，以响应生理需求。PLIN 包括多个亚型，其中最为研究广泛的是 PLIN1。PLIN1 通过调节磷酸化状态来影响细胞内脂肪酸酯的降解^[23]。据研究表明，PLIN1 在乳腺癌中表达下调，并且激素受体阳性乳腺癌的 PLIN1 表达降低与不良预后和总生存期降低相关。

4. 乳腺癌细胞中脂肪酸氧化的异常

脂肪酸氧化 (Fatty acid oxidation, FAO) 是脂肪酸分解的主要途径，脂肪酸进入线粒体内，被 β -氧化系统逐渐氧化分解为二氧化碳和水并释放能量。其中，关键的调控步骤涉及长链脂肪酸跨线粒体膜的转运，这一过程主要由肉碱棕榈酰转移酶 1 (CPT1) 催化完成，它负责将脂肪酸有效地引入到线粒体的代谢网络中。CPT1 有三种亚型：A、B 和 C。CPT1A 已被证明是乳腺癌中过表达的主要亚型，且免疫组织化学结果表明，CPT1A 蛋白在 HER2 阳性的乳腺肿瘤中具有表达优势，参与乳腺癌细胞生长增殖、细胞死亡逃逸和侵袭进程，敲低 CPT1 或用 FAO 抑制剂在体外和体内治疗显著增强了激素受体阳性乳腺癌细胞对内分泌治疗的反应^[24]。此外，CPT1C 亚型也被证实具有在代谢压力状态下增强细胞生存能力以及促进乳腺肿瘤增殖的特性^[25]。

综上所述，乳腺癌细胞表现出异常的脂肪酸代谢过程，包括脂肪酸合成的增加、脂滴的积累以及脂肪酸氧化活性的改变等。这些变化导致乳腺癌细胞对脂肪酸代谢的依赖性增加，脂肪酸代谢重编程在乳腺癌的进展中具有重要影响，不仅促进乳腺癌细胞的增殖和迁移，还增强癌细胞的干性等恶性特征。因此，研究脂肪酸代谢重编程在乳腺癌中的作用机制和调控网络，可以为乳腺癌的发展机制提供新的认识，并为乳腺癌的治疗和预防提供新的靶点策略。

1.3 CircRNA 研究进展

1. CircRNA 的发现

CircRNA (Circular RNA, circRNA) 是一类以单链、共价、闭合环状结构为特征的非编码 RNA^[26]。其在真核细胞胞质内的存在，最早于 1979 年通过电子显微镜技术被观察到，由于当时技术限制和 circRNA 特殊的结构特点，这些分子的功能和意义并没有被深入了解^[27]。近年来，由于高通量测序和生物信息技术的快速发展，发现了大量 circRNA 分子，并逐渐成为非编码 RNA 领域新的明星分子^[28]。

2. CircRNA 的特点

CircRNA 根据其来源可分为三类：外显子来源的 circRNA，内含子来源的 circRNA，以及由外显子和内含子共同组成的 circRNA。外显子来源的 circRNA 在真核细胞的胞质和胞核中广泛存在，而少部分来自内含子的主要存在于细胞核中发挥作用。CircRNA 的表达水平具有种属、组织和时间特异性，但序列上具有一定保守性，提示 circRNA 可能

在重要的生物过程和调控网络中发挥着关键的角色。不同于线性 RNA 具有经典的 5'和 3'端结构, circRNA 通过特殊的反向剪接生成^[29], 缺少 5'端的帽子和 3'端的 poly A 尾序列^[30, 31]。因此, circRNA 在体内表现出更高的稳定性, 不容易受到 RNA 外切酶或核糖核酸酶 R (RNase R) 的降解影响。CircRNA 一般在转录或转录后水平发挥调控作用, 意味着它们可以通过与其他分子相互作用, 调控基因的转录和表达水平, 从而影响细胞的功能和生理进程。而且, 有研究发现, 尽管大多数 circRNA 是非编码的, 但是也有少数 circRNA 可以翻译为多肽, 产生有功能的蛋白参与细胞的调控网络。

3. CircRNA 的功能

尽管 circRNA 之前一直被认为是 mRNA 拼接过程的错误结果, 近年来相关研究的爆炸式增长, 发现其功能作用不一定亚于亲本基因, 它不仅是 mRNA 剪接的副产物, 更是可变剪接的新型调控产物, 在细胞分化、组织稳态以及疾病发展中发挥重要功能。作为 miRNA 分子的海绵, circRNA 含有大量的 miRNA 结合位点, 具有海绵吸附作用, 进而间接调控 miRNA 下游靶基因的表达^[32], 例如第一个被揭示调控功能的 circRNA—ciRS7, 含有 miR7 的 470 个保守结合位点, 可以作为 miR7 的吸附海绵来抑制 miR7 活性以增加 miR7 靶向致癌基因的表达^[33]。据报道, 一些由外显子和内含子序列构成的 circRNA, 如 circEIF3J 和 circPAIP2 成环后通过与 snRNA 的特定 RNA-RNA 相互作用结合到亲本基因的启动子区, 与 Pol II 互作调控亲本基因的转录^[34]。尽管归类被为非编码 RNA, 目前却也发现许多 circRNA 编码蛋白发挥功能的实例, 苏士成团队发现, circFAM53B 在乳腺癌组织中特异性高表达水平, 并且编码肽段诱导抗肿瘤免疫反应, 研发 circFAM53B 疫苗能抑制肿瘤进展, 开启了 circRNA 肿瘤疫苗新时代^[35]。此外, circRNA 能够直接与蛋白质相互作用或者作为蛋白质互作的脚手架, 调节蛋白质的功能或稳定性, 比如, circMBOAT2 已经被证实能够通过直接结合 RNA 结合蛋白 PTBP1 来激活脂肪代谢的重编程进而促进胰腺癌的恶性进展^[36]。

1.4 CircRNA 与激素受体阳性乳腺癌

CircRNA 作为一种新兴的非编码 RNA, 在细胞内具有独特的环形结构和多样化的功能机制。研究表明, circRNA 通过充当 miRNA 的“海绵”、与蛋白质相互作用、调节转录和翻译等方式, 参与调控基因表达、细胞增殖、迁移等多种生物学过程^[29, 31]。特别在激素受体阳性乳腺癌中, circRNA 的作用尤为引人注目。它通过影响激素受体相关基因的表达、调控关键下游信号通路的激活状态以及调节细胞周期等途径, 对乳腺癌细胞的生长、增殖和转移等恶性特征具有重要影响, 展现出巨大潜力。我们亟需深入研究 circRNA 在激素受体阳性乳腺癌中的生物学功能和作用机制, 有望揭示更多与激素受体阳性乳腺癌相关的分子诊断标志物, 并为未来的个体化和精准化治疗提供更为有效的策

略和手段。

近年来,越来越多的研究表明 circRNA 在激素受体阳性乳腺癌中扮演着各种重要的角色。Sang 等人识别并鉴定了在激素受体阳性乳腺癌临床样本中低表达的 hsa_circ_0025202, 可以充当 miR-182-5p 的 miRNA 海绵, 并进一步调节 FOXO3a 的表达和活性以实现肿瘤抑制和增强他莫昔芬的疗效^[37]。Chen 等发现缺氧诱导的 circPFKFB4 直接与特异性损伤结合蛋白 DDB1 和 DDB2 结合, 并促进 CRL4DDB2 E3 泛素连接酶组装, 从而促进激素受体阳性乳腺癌进展转移^[38]。Yang 等筛选并鉴定了由 β -连接蛋白 (CTNNB1) 产生的具有顺式作用的 circ-CTNNB1, 作为癌症进展的新驱动因素。功能上, circ-CTNNB1 在激素受体阳性乳腺癌组织和细胞系中表达上调, 并与癌症患者的不良预后相关, 机制上, circ-CTNNB1 结合 DDX3, 促进其对转录因子 YY1 的反式激活作用, 从而调控与 β -连接蛋白下游信号转导通路和癌症进展相关的下游基因的转录表达^[39]。

在本研究中, 我们通过对 GEO 数据库中的高通量芯片进行生物信息学分析, 筛选出在激素受体阳性乳腺癌中高表达的 circSCAP。在临床样本和细胞系中进行表达分析, 发现其可能作为癌基因得角色发挥作用。通过功能分析, 验证 circSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌脂肪酸代谢重编程以及增殖转移等恶性进展的能力。进一步通过质谱分析、双荧光素酶报告基因等实验技术揭示, circSCAP 促进 SCD1 介导的脂肪代谢进程, 以影响癌细胞增殖转移的具体机制。

第一部分 激素受体阳性乳腺癌相关 circRNA 的筛选及表达分析研究

研究目的

1. 筛选与激素受体阳性乳腺癌相关的 circRNA;
2. 检测乳腺癌组织及细胞系中 circSCAP 的表达水平并分析其与激素受体阳性乳腺癌患者临床特征及预后的相关性。

材料与amp;方法

1. 实验材料

1.1 细胞系

本部分研究从美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC) 购置所需使用的细胞系, 包括 MCF-7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-468、SKBR3、ZR-75-1、HS578T、MCF-10A 和 HEK-293T。

1.2 临床样本

我们选择 2008 年至 2016 年在山东大学齐鲁医院确诊为激素受体阳性乳腺癌的 109 例患者。所有患者在手术和组织病理检查后, 在征得患者知情同意的情况下留存组织样本。我们与山东大学齐鲁医院生物样本资源库合作, 建立了规范的取样、存储和随访制度。所有样本在取材后迅速处理, 确保在 30 分钟内完成包括取材、运输、分装在内的操作, 随后立即被置于-80℃的超低温冰箱中保存。我们所获取的肿瘤组织信息经过了术后病理学的严格证实, 并依据美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 和国际抗癌联盟 (Union for International Cancer Control, UICC) 的分期标准, 对病理学特性、临床病理学分类和分期进行评估。在收集样本前, 已确保患者充分了解并同意参与。整个样本收集过程符合国际标准, 并通过了山东大学齐鲁医院伦理委员会的审查批准。

1.3 实验试剂

1.3.1 细胞培养和冻存相关试剂

名称	公司	保存条件
青霉素/链霉素混合液 (100×)	北京 Macgene 公司	4℃
RPMI-1640 培养基	北京 Macgene 公司	4℃

二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma-Aldrich 公司	室温避光
胎牛血清 (FBS)	赛尔博克斯生物科技有限公司	-20°C
DMEM/F12 培养基	北京 Macgene 公司	4°C
胰酶-EDTA (10×)	北京 Macgene 公司	4°C
McCoy's 5a 培养基	北京 Macgene 公司	4°C
马血清 (HS)	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
磷酸盐缓冲液 PBS	武汉普诺赛生命科技有限公司	4°C
DMEM (高糖) 培养基	北京 Macgene 公司	4°C

1.3.2 RNA 提取相关试剂

名称	公司	保存条件
RNA-easy Isolation Reagent	南京诺唯赞公司	4°C
DEPC 水	美国 Sigma-Aldrich 公司	4°C
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	室温避光
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	室温避光

1.3.3 实时定量 PCR 相关实验试剂

名称	公司	保存条件
SYBR Green qPCR 试剂盒	湖南艾科瑞生物有限公司	-20°C
DEPC 水	美国 Sigma-Aldrich 公司	4°C

1.4 实验耗材

实验耗材	公司
6/12/24/48/96 孔板	德国 Eppendorf 公司
6 cm/10 cm 皿	德国 Eppendorf 公司
15 mL 离心管	美国康宁公司
0.22 μm/0.45 μm 滤器	美国 Millipore 公司
医用橡胶手套	中国蓝帆医疗股份有限公司
封口膜 parafilm	英国施莱登股份有限公司

1.5 溶液配置

1.5.1 细胞冻存液

名称	比例
FBS	90%
DMSO	10%

1.6 主要设备及仪器

名称	公司
----	----

移液枪	德国 Eppendorf 公司
组织匀浆器	德国 IKA 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
微型常温离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
低温高速离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
全自动纯水仪	美国 Millipore 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
NanoDrop 2000	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温培养箱	中国精宏实验设备公司
全自动高压蒸汽灭菌锅	上海聚慕医疗器械有限公司
恒温水浴锅	德国 GFL 公司
-20℃冰箱	日本松下集团
4℃冰箱	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温干燥箱	美国明尼苏达矿业与制造公司
液氮罐	美国赛默飞世尔科技有限公司

2. 实验方法

2.1 细胞复苏

- 1) 将-80℃冷冻保存的细胞样本快速取出，并放到 PE 手套中。
- 2) 将 PE 手套握紧一端并迅速在已预热 37℃温水浴中来回晃动，直至冷冻的细胞重新融化为细胞悬液。
- 3) 从 PE 手套中将细胞冻存管取出，并用 75%酒精对管外壁进行消毒。
- 4) 将细胞悬液小心地转移至装有 5 mL 完全培养基的 15 mL 离心管中。
- 5) 使用另一个 15 mL 离心管与之配平后对称放入离心机，设置条件 25℃, 800 rpm, 5 min。
- 6) 离心结束后，取出带有细胞悬液的 15 mL 离心管，吸弃上层培养基，留下细胞沉淀。
- 7) 向培养皿中加入适量培养基，用 1 mL 培养基重悬细胞沉淀后，加入到培养皿中，上下左右均匀晃动培养皿，将细胞混悬后放入培养箱。
- 8) 待细胞慢慢适应环境，贴壁展开后进行换液，随后培养传代。

2.2 细胞培养

本研究中所使用的细胞系均购自 ATCC，并培养在添加有 10%胎牛血清和 1%青霉

素-链霉素的标准培养基中。MCF-7、HS578T、MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞培养于完全 DMEM 培养基中；T47D 和 ZR-75-1 细胞培养于 RPMI-1640 培养基，培养基中添加 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素和 0.2 Units/mL 胰岛素；SKBR-3 细胞在 McCoy's 5a 培养基中培养，培养基中添加 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素；MCF-10A 细胞在添加 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、20 ng/mL 表皮生长因子、100 ng/mL 霍乱毒素、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松和 5%马血清的 DMEM/F12 培养基中生长。所有细胞都在 37°C 的含有 95%空气和 5% CO_2 气体混合物的恒温培养箱中生长。

2.3 细胞冻存

1) 观察细胞：观察密度及状态是否符合冻存要求：将所要冻存的细胞取出，在光学显微镜下观察，若密度达到 80%左右，生长状态良好，且无细菌或其他病原体污染则准备接下来的冻存步骤。

2) 收集细胞：使用移液枪，将细胞用 PBS 洗涤 3 遍后，加入胰酶，放入 37°C 恒温培养箱进行消化，等细胞不再展开，缩聚回球形且大部分不再贴壁后，加入等量的含有血清的培养基终止消化。将消化下的细胞使用移液枪收集到 15 mL 离心管中。

3) 获得细胞沉淀：将带有细胞悬液的 15 mL 离心管对称配平后放入离心机，设置条件 25°C，800 rpm，5 min。

4) 配置冻存液：以 9: 1 的比例将 FBS 和 DMSO 混匀备用。

5) 冻存细胞：将离心结束的 15 mL 离心管取出，小心吸弃上层，用配置好的冻存液重悬细胞沉淀并分装进冻存管，迅速放入梯度冻存盒。接着，将冻存盒放入 -80°C 超低温冰箱进行梯度降温。24 h 后，已冷冻的细胞被转移到相应的样本存储盒内，以确保长期保存。

2.4 样本总 RNA 提取

(1) 细胞样本总 RNA 提取

1) 将处理后的细胞从细胞培养箱中取出，弃置培养基，加入 PBS 洗涤 3 次。

2) 向每个 6 孔板的细胞培养基中添加 500 μL 的 RNA-easy Isolation Reagent，确保细胞完全浸没，随后使用移液枪轻轻吹打以释放细胞。

3) 转移液体至 1.5 mL 离心管中，反复吹打直至液体澄清，室温静置 5 min。

4) 向上述裂解液中加入 200 μL DEPC 水，使用涡旋震荡器快速震荡 15 s，随后静置室温 5 min。

5) 在室温下，以 12,000 g 转速离心 15 min。

6) 取出离心管，溶液分为透明的上层(含 RNA)和暗色的下层沉淀(含杂质)，小心转移上层至一个新的离心管。

7) 向 RNA 溶液中加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 min。

8) 加入 500 μL 用 DEPC 水配制的 75%乙醇，上下颠倒以充分洗涤，同时轻弹管底，

使沉淀悬浮。

- 9) 在室温下, 以 8,000 g 转速离心 3 min, 吸弃上清。
- 10) 重复步骤 6 和 7, 弃尽上清。
- 11) 加入适量的 DEPC 水溶解沉淀, 室温涡旋 3 min, 完全溶解沉淀。
- 12) 测量提取的 RNA 浓度, 将提取的 RNA 产物分装后在 -80°C 长期保存。

(2) 组织样本总 RNA 提取

1) 提前准备好冰盒, 标记好的 1.5 mL EP 管于冰上预冷, 将冻存于 -80°C 的乳腺癌组织和癌旁组织取出, 用镊子分放在对应的预冷 EP 管中, 于冰上解冻。

2) 解冻后的组织放在一个 6 cm 皿中, 用手术刀切碎后转移至离心管中, 大约每 25 mg 组织加入 500 μ L RNA-easy Isolation Reagent, 随后使用电动组织研磨器研磨样品, 使样品充分裂解。后续步骤同细胞样本总 RNA 的提取过程。

2.5 总 RNA 反转录为 cDNA 文库

核酸制备根据艾科瑞生物公司 Evo M-MLV 逆转录试剂盒的说明书, 具体步骤如下:

1) 按照下列表格中的反应体系, 去除基因组 DNA

试剂	加入量
Total RNA	2.0 μ g
gDNA Clean Reagent	1.0 μ L
5 \times gDNA Clean Buffer	2.0 μ L
RNase free water	补齐至 10.0 μ L

轻轻吹打混匀, PCR 反应程序为 42°C 2 min。

2) 按照下列表格中的反应体系, 配置反转录反应液

试剂	加入量
去除基因组 DNA 的反应液	10.0 μ L
5 \times RTase Reaction Buffer Mix I	4.0 μ L
Random 6 mers Primer (400 μ M)	1.0 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	1.0 μ L
RTase Enzyme Mix	1.0 μ L
RNase free water	补齐至 20.0 μ L

轻轻吹打混匀, PCR 反应程序为 37°C 15 min, 85°C 5 s。

2.6 实时定量 PCR 表达分析

实时定量 PCR 根据艾科瑞生物公司的 SYBR Green qPCR 试剂盒按照下列表格中的反应体系, 进行定量 PCR 分析:

试剂	加入量
引物 1 (10 μ M)	0.2 μ L

引物 2 (10 μ M)	0.2 μ L
cDNA	2.0 μ L
2 \times SYBR Green Premix	5.0 μ L
RNase free water	补齐至 10 μ L

将上述反应混合液加入 96 孔反应板中，使用 Roche 公司的实时定量 PCR 仪进行，PCR 反应程序如下：

Stage 1	预变性	Sep:1	95 $^{\circ}$ C	30 s
Stage 2	循环反应	Seps:40	95 $^{\circ}$ C	10 s
			60 $^{\circ}$ C	30 s
Stage 3	溶解曲线	Sep:1	95 $^{\circ}$ C	15 s
			60 $^{\circ}$ C	60 s
			95 $^{\circ}$ C	15 s

反应过程中使用到的引物具体如下：

名称	序列
Actin	Forward: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC
	Reverse: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
CircSCAP	Forward: GCTGCCGTGGTCACAGTG
	Reverse: TTTGCGGTCAGAGTCCACAG

2.7 数据统计与分析

所有数据分析均使用 GraphPad Prism 8.0 和 IBM SPSS Statistics V23.0 进行。除非另有说明，一般对两组样本之间差异的分析进行双侧 Student T 检验。采用 Kaplan-Meier 分析绘制生存曲线以及 log-rank 检验统计分析两组生存曲线之间的差异的方法对乳腺癌患者的预后进行分析。Pearson 相关系数用于评估不同样本指标之间的相关性。所有统计数据均以图中的平均数 (Mean) \pm 标准差 (Standard Deviation, SD) 表示， $p < 0.05$ 为有统计学意义。

研究结果

1. CircSCAP 在激素受体阳性乳腺癌中高表达

为了识别乳腺癌中潜在作用的 circRNA，我们使用 GEO 数据库 (GEO: GSE101124) 进行生物信息学分析，以 fold change > 2.0 和 t 检验 $p < 0.05$ 为阈值标准，筛选出 149 个乳腺癌组织和正常组织中差异表达的 circRNAs (图 1A)，包括 94 个上调的 circRNAs 和 55 个下调的 circRNAs (图 1B)。经过肿瘤细胞和正常细胞的 RT-qPCR 表达对比分

析, hsa_circ_0065214 在前 8 个上调的差异 circRNA 中具有表达水平优势, 并且迄今为止尚未在乳腺癌中有研究报道(图 1C)。因此, hsa_circ_0065214 最终被选为我们的目标分子。根据人类基因组和 CircBase 数据库注释, hsa_circ_0065214 来源于亲本基因 SCAP, 也被命名为 circSCAP。

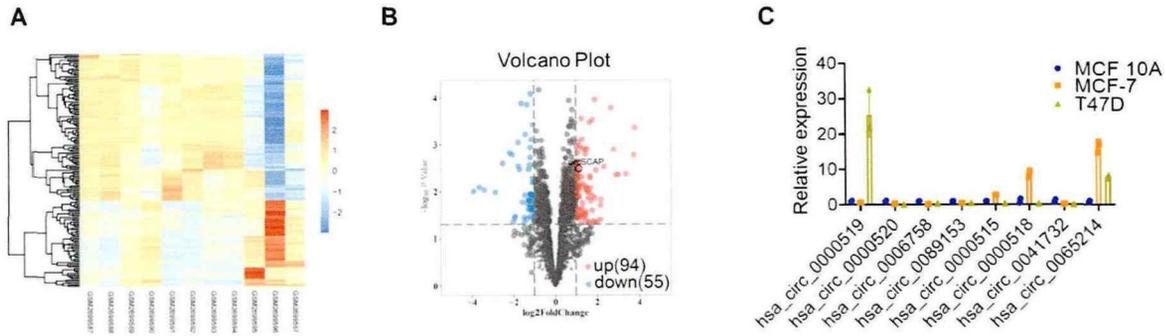


图 1 CircSCAP 为激素受体阳性乳腺癌特异上调 circRNAs
Fig. 1 CircSCAP specifically upregulated in HR+ breast cancer

(A) 乳腺癌组织和正常乳腺组织中显著差异表达的 circRNAs 的热图。红色表示 circRNA 上调, 蓝色表示 circRNA 下调。(B) CircRNA 表达谱的火山图。(C) 前 8 个表达升高的 circRNA 在 MCF-10A、MCF-7 和 T47D 细胞中表达水平的 RT-qPCR 分析。

接着, 我们首先使用 RT-qPCR 对比分析不同分子亚型乳腺癌组织和正常组织中 circSCAP 的表达差异, 与其他亚型组织 (HER2 富集型和 TNBC) 相比, circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌组织 (Luminal A 和 Luminal B) 中特异性上调, 这表明 circSCAP 可能与激素受体阳性乳腺癌的恶性行为有关(图 2A)。同时, 在不同分子亚型乳腺癌细胞系中, 我们进一步检测 circSCAP 的表达水平, 发现在激素受体阳性乳腺癌细胞中的表达水平显著高于其他亚型的乳腺癌细胞(图 2B)。以上结果说明, circSCAP 为激素受体阳性乳腺癌特异上调的 circRNA。

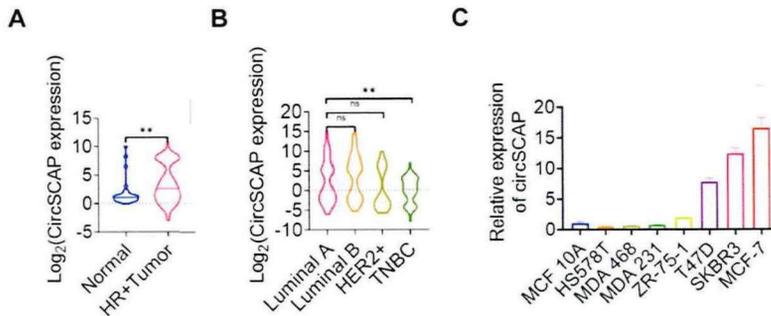


图 2 CircSCAP 在乳腺癌中的表达差异

Fig. 2 The expression difference of circSCAP in breast cancer

(A) 正常组织和激素受体阳性乳腺癌组织中 circSCAP 表达水平的 RT-qPCR 分析。(B) 四

种乳腺癌组织亚型中 circSCAP 表达水平的 RT-qPCR 分析, 包括 Luminal A 型 (n = 48)、Luminal B 型 (n = 61)、HER2 富集型 (n = 19) 和 TNBC (n = 59)。(B) 不同乳腺癌细胞系中 circSCAP 表达水平的 RT-qPCR 分析。

2. CircSCAP 的表达水平与激素受体阳性乳腺癌患者临床病理学特征及预后相关

我们随机选取 109 名激素受体阳性乳腺癌患者, 根据 circSCAP 表达水平的高低分为两组, Kaplan-Meier 生存分析发现, circSCAP 高表达与总生存期 (Overall survival, OS) 和无病生存期 (Disease-free survival, DFS) 结果较差有关 (图 3A-B)。CircSCAP 表达和患者基本特征的分布如表 1 所示, 可见 circSCAP 表达与患者的复发密切相关。此外, 进一步的单因素和多因素分析, 证明 circSCAP 的高表达是激素受体阳性乳腺癌中 DFS 和 OS 的独立预后预测因子 (表 2-3)。综合上述结果表明, 高表达的 circSCAP 可能在激素受体阳性乳腺癌的恶性进展过程中具有促癌基因的作用, 且与不良预后相关, 值得进一步研究。

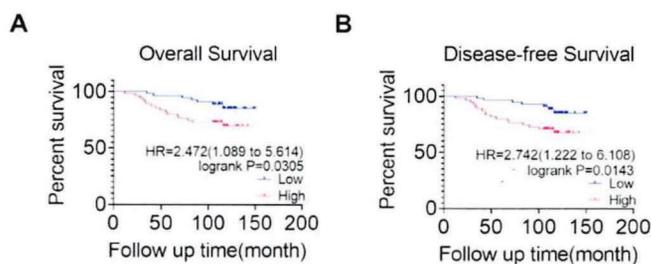


图 3 CircSCAP 在激素受体阳性乳腺癌中的生存分析

Fig. 3 Survival analysis of circSCAP in HR+ breast cancer

(A-B) 使用 Log-rank 检验对山东大学齐鲁医院激素受体阳性乳腺癌患者队列 (n=109) 的总生存率 (A) 和无病生存率 (B) 进行 Kaplan-Meier 生存分析。

表 1 激素受体阳性乳腺癌患者临床病理特征分布

Variable	CircSCAP expression		P
	Low(n=55)	high(n=54)	
Age			0.694
<45	22	19	
≥45	33	35	
Histological Grade			0.827
G1/G2	39	41	
G3	15	13	
Unknown	1		
Tumor size			0.839
≤2cm	17	19	

>2cm	35	35	
Unknown	3		
Lymph node metastasis			0.698
Negative	34	31	
Positive	21	23	
KI67 status			0.687
Low	17	19	
High	38	35	
Recurrence			0.036
No	48	38	
Yes	7	16	

表 2 激素受体阳性乳腺癌患者总生存期的单因素和多因素分析

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age				
<45	Reference			
≥45	1.516(0.622-3.693)	0.36		
Histological Grade				
G1/G2	Reference			
G3	0.825(0.35-1.947)	0.661		
Unknown				
Tumor				
≤2cm	Reference			
>2cm	0.739(0.304-1.796)	0.504		
Unknown				
Lymph node metastasis				
Negative	Reference			
Positive	4.907(1.933-12.457)	0.001	1.984(0.757-5.205)	0.164
KI67 status				
Low	Reference			
High	2.558(0.87-7.525)	0.088		
Recurrence				
No	Reference			
Yes	181.319(24.069-1365.98)	4.48E-07	140.387(18.276-1078.369)	2.00E-06
CircSCAP expression				
Low	Reference			
High	2.669(1.098-6.492)	0.03	1.559(0.635-3.832)	0.333

表 3 激素受体阳性乳腺癌患者无病生存期的单因素和多因素分析

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age				
<45	Reference			
≥45	1.622 (0.671-3.92)	0.283		
Histological Grade				
G1/G2	Reference			
G3	1.147 (0.491-2.681)	0.752		
Unknown				
Tumor				
≤2cm	Reference			
>2cm	0.987(0.432-2.258)	0.976		
Unknown				
Lymph node metastasis				
Negative	Reference			
Positive	3.419(1.462-7.995)	0.005	3.635(1.550-8.525)	0.003
KI67 status				
Low	Reference			
High	1.601(0.635-4.036)	0.319		
Recurrence				
No	Reference			
Yes	25234.252(0.000028-2.260E+13)	0.3350		
CircSCAP expression				
Low	Reference			
High	2.858(1.185-6.896)	0.019	3.074(1.269-7.446)	0.013

第二部分 CircSCAP 环状特性及亚细胞定位的研究

研究目的

- 1.检测 circSCAP 是否具有 circRNA 典型的环状结构特性;
- 2.探究 circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌细胞的亚细胞定位及作用潜能。

材料与amp;方法

1. 实验材料

1.1 细胞系

本部分研究中所使用的细胞系同第一部分 1.1

1.2.实验试剂

1.2.1 细胞冻存和培养相关试剂

本部分研究中所使用的试剂同第一部分 1.3.1

1.2.2 RNA 提取、反转录及实时定量 PCR 相关试剂

本部分研究中所使用的试剂同第一部分 1.3.2

1.2.3 RNA 稳定性实验相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
放线菌素 D	美国 Sigma-Aldrich 公司	-20°C
RNase R (20 U/μL)	吉赛生物科技股份有限公司	-20°C

1.2.4 琼脂糖电泳相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
琼脂糖粉	西班牙 BLOWEST 公司	室温
6×DNA 上样缓冲液	南京诺唯赞公司	4°C
YeaRed Nucleic Acid Gel Stain	上海翌圣生物科技有限公司	4°C
DNA Ladder	北京天根有限公司	4°C

1.2.5 RNA-FISH 实验相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
4%多聚甲醛	北京素莱宝科技有限公司	4°C
抗荧光淬灭剂	上海碧云天公司	4°C

1.3 实验耗材

本部分研究中所使用的耗材同第一部分 1.4

1.4 溶液配置

琼脂糖电泳所需 50×TAE 溶液

试剂	加入量
0.5mmol/L EDTA (pH=8.0)	200 mL
冰醋酸	57.1 mL
Tris-base	242 g

1.5 主要仪器和设备

名称	公司
移液枪	德国 Eppendorf 公司
超净工作台	ESCO 公司-新加坡
微型常温离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
低温高速离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
全自动纯水仪	美国 Millipore 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
NanoDrop 2000	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温培养箱	中国精宏实验设备公司
凝胶成像系统	美国 ProteinSimple 公司
-20℃冰箱	日本松下集团
4℃冰箱	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温干燥箱	明尼苏达矿业与制造公司-美国
液氮罐	美国赛默飞世尔科技有限公司

2. 实验方法

2.1 细胞培养、冻存、复苏

相关实验方法参见第一部分 2.1 - 2.3

2.2 细胞样本总 RNA 提取、反转录及实时定量 PCR 表达分析

相关实验方法参见第一部分 2.4-2.6, 反应过程中使用到的引物具体如下:

名称	序列
Actin	Forward CACCATGGCAATGAGCGGTTC
	Reverse AGGTCCTTGCGGATGTCCACGT

CircSCAP	Forward	GCTGCCGTGGTCACAGTG
	Reverse	TTTGCGGTCAGAGTCCACAG
GAPDH	Forward	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	Reverse	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
U6	Forward	CTCGCTTCGGCAGCACAT
	Reverse	TTTGCGTGTGCATCCTTGCG
LinearSCAP	Forward	CTCTGGGATCAGGAGCTTGGAGGAG
	Reverse	CTTTGAGTGTGGCTGAAGTCTGCAG
SCD1	Forward	CCTGGTTTCACTTGGAGCTGTG
	Reverse	TGTGGTGAAGTTGATGTGCCAGC

2.3 细胞样本基因组 DNA 提取

我们使用天根生化科技有限公司的细胞基因组 DNA 提取试剂盒，具体实验步骤如下：

1) 在贴壁生长的细胞培养中，首先添加胰酶溶液以温和地消化细胞，接着加入含血清的培养基来中止消化过程。随后，使用移液器轻轻吹打细胞，使细胞从培养皿上脱离并形成均匀的细胞悬浮液。最后，将悬浮液转移至 1.5 mL 离心管内。

2) 将上述悬液以 10,000 rpm 转速离心 1 min，吸弃上清，并加入 200 μ L 缓冲液 GA 振荡混匀。

3) 加入 20 μ L Proteinase K 溶液，混合均匀。同时，启动金属浴预热至 70 $^{\circ}$ C。

4) 继续加入 200 μ L 缓冲液 GB，通过上下颠倒彻底混合，然后，在 70 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min 后瞬离。

5) 随后，加入 200 μ L 无水乙醇，震荡混合 15s 后短暂离心。

6) 将上一步所得混合液和沉淀加入吸附柱中，以 12,000 rpm 转速离心 30 s，倾倒废液，再将吸附柱放回收集管中。

7) 确认缓冲液 GD 提前加入无水乙醇，向吸附柱中加入 500 μ L 上述缓冲液 GD，以 12,000 rpm 转速离心 30 s，随后倒掉收集管中的液体，将吸附柱重新置于收集管内。

8) 确认漂洗液 PW 提前加入无水乙醇，向吸附柱中加入 600 μ L 上述漂洗液 PW，以 12,000 rpm 转速离心 30 s。重复此步骤两遍。

9) 将吸附柱重新置于收集管内，以 12,000 rpm 转速离心 3 min，随后倾倒收集管内的液体。让吸附柱在室温下自然静置约 8 min。

10) 将吸附柱更换至另一洁净 1.5 mL 离心管中，向吸附膜的中间部位小心滴加适量三蒸水，室温静置 8 min，离心收集离心管中的洗脱液。

11) 将收集到的基因组 DNA 进行浓度测定，并在离心管管身标记名称、浓度和日期。

2.4 放线菌素 D 处理细胞

- 1) 将贴壁培养的细胞收集后重悬，均匀铺至六个六孔板的孔中。
- 2) 待到细胞贴壁后，实验孔中按照时间梯度 0h、4h、8h、12h、16h、24h 加入终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的放线菌素 D。
- 3) 加药培养至相应时间后，每孔用移液枪吸弃培养基，然后用 PBS 清洗三遍。
- 4) 每个样本加入 500 μL RNA-easy Isolation Reagent 试剂按照上述实验步骤提取细胞总 RNA，对提取的总 RNA 反转录后进行 RT-qPCR 分析。

2.5 RNase R 消化实验

- 1) 收集贴壁培养的细胞，按照上述实验步骤进行细胞总 RNA 的提取。
- 2) 按照下述反应体系添加反应液：

试剂	加入量
总 RNA	3.0 μg
10 \times RNase R reaction Buffer	2.0 μL
RNase R (20 U/ μL)	1.0 μL
DEPC 水	补齐至 20.0 μL

- 3) 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min，并在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min。
- 4) 将消化后的 RNA 纯化，通过上述 PCR 检测和琼脂糖凝胶电泳比较环状 RNA 和线状 RNA 条带位置及表达。

2.6 琼脂糖电泳

1) 制备琼脂糖凝胶：使用预先配置好的 50 \times TAE 缓冲液稀释成 1 \times TAE 缓冲液，按比例在锥形瓶中加入琼脂糖粉末及 TAE 缓冲液中配置成 1-1.5%的琼脂糖凝胶将混合物放入微波炉中煮沸，使其完全溶解至无色透明，然后冷却至适宜温度，加入 DNA 核酸染料混合均匀后倒入凝胶平板中，插入梳子，放置凝固。

2) 放置琼脂凝胶：待平板中凝胶凝固成半透明固体，即取出，平稳拔出梳子，置于电泳槽中，加入足够的电泳缓冲液没过凝胶最上端。

3) 样品处理：在样本槽两端加入 DNA marker，将待分析样品与 6 \times DNA 上样缓冲液混合，使用最大量程为 10 μL 的移液枪加载到凝胶槽中。

4) 接通电源：检查电极正负极方向，接通直流电源，使 DNA 在电场作用下沿凝胶移动。

5) 图像分析：使用凝胶成像系统观察各泳道上的发光带状物，并根据迁移距离和大小进行分析和测量。

2.7 核质分离实验

我们使用 Invitrogen 公司的 PARISTM 核质分离试剂盒分别提取核和细胞质 RNA，具体实验步骤如下：

- 1) 将贴壁培养的细胞从 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中取出，加入 PBS 洗涤 3 次，随后加入胰

酶将细胞消化，转移至离心管中，800 rpm 离心 5 min。

2) 先用冰冷的 PBS 溶液对细胞进行三次温和的洗涤，接着加入 300 μ L 预冷的预先冷却的细胞裂解缓冲液对细胞进行裂解，置于冰上 10 min，随后，轻轻刮下并收集裂解液转移到一个冰冷的离心管内。

3) 将离心机预先制冷到 4 $^{\circ}$ C，使用低速离心来保持细胞核完整，将细胞 500 g 离心 5 min。

4) 使用 200 μ L 移液枪将含有细胞质提取物的上清液小心转移到冰上新 1.5 mL 离心管中，并向含有细胞核的不溶性沉淀加入冰上预冷的细胞破碎缓冲液。

5) 同样离心条件再次离心 5 min，将含有细胞核提取物的上清液转移到冰上新 1.5 mL 离心管中。

6) 将细胞质提取物和细胞核提取物在室温下分别加入等体积的 2 \times 裂解/结合溶液混合，准备进行 RNA 分离。

7) 使用 1.25 倍上述裂解液体积的 100%乙醇溶解裂解物并轻轻混合。

8) 用过滤器过滤混合物并离心 30 s，弃掉底部收集管中的废液。

9) 向上层过滤器中加入 700 μ L 洗涤液 1，离心 1 min。弃掉底部收集管中的废液，并重复使用试管进行后续洗涤。

10) 向上层过滤器中加入 500 μ L 洗涤液 2/3。再次离心 1 min。弃掉底部收集管中的废液。并再次重复洗涤。

11) 将上层过滤器放入新的收集管中。并加入预热至 95 $^{\circ}$ C 的 DEPC 水滴加到过滤器的中心。收集离心到收集管中的 RNA 到新的 1.5 mL 离心管中。

12) 对细胞核和细胞质 RNA 进行浓度测定，准备用于后续 RT-qPCR 分析或者存储到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

2.8 RNA 荧光原位杂交 (Fluorescence in Situ Hybridization)

实验前，先根据实验具体流程利用试剂盒中的实验试剂配置好以下实验材料：

试剂	规格	保存条件
Buffer A (TritonX-100)	0.1%	室温
Buffer C (20 \times SSC)	4 \times	室温
Buffer C (20 \times SSC)	2 \times	室温
Buffer C (20 \times SSC)	1 \times	室温
Buffer F (Tween 20)	0.1%	室温
探针储存液	100 μ M	-20 $^{\circ}$ C 避光
DAPI 工作液	0.1%	室温避光

具体实验步骤如下：

1) 细胞铺板时，在 24 孔板中小心放入无菌的细胞爬片，随后按照 50-60% 的密度将处理过的细胞接种于 24 孔板中，在培养箱中过夜贴壁。

- 2) 移除培养基, 使用移液枪依次加入两遍 PBS 洗涤细胞, 每次 5min。随后用移液枪吸弃 PBS, 并加入 100 μ L 4%多聚甲醛进行细胞固定, 室温静置 15 min。
- 3) 移除 4%多聚甲醛, 并用移液枪加入 100 μ L 0.1%Buffer A, 室温静置 15 min。
- 4) 移除 0.1%Buffer A, 使用移液枪依次加入两遍 PBS 洗涤细胞, 每次 5 min。随后用移液枪吸弃 PBS, 并加入 100 μ L 2 \times Buffer C, 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱放置 30 min。
- 5) 提前预热 73 $^{\circ}$ C金属水浴锅, 并将 Buffer E 加入 1.5 mL 离心管中 73 $^{\circ}$ C孵育 30 min。
- 6) 快速加入预热的稀释探针储存液, 继续放在 73 $^{\circ}$ C金属浴变性 5 min, 第一次实验需进行预实验, 设置不同探针工作浓度梯度, 例如: 0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M 等。
- 7) 移除 2 \times Buffer C, 并加入 100 μ L 变性后的探针混合液, 确保实验过程避光, 并将样品置于 37 $^{\circ}$ C的恒温培养箱内, 过夜杂交。
- 8) 次日, 从恒温 37 $^{\circ}$ C培养箱中取出样本, 移除探针混合物。随后, 每孔中加入预先加热至 42 $^{\circ}$ C的 0.1% Buffer F 100 μ L, 进行 5 分钟的温和洗涤。
- 9) 移除 0.1%Buffer F, 并加入 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times Buffer C 温和洗涤 5 min。
- 10) 移除 2 \times Buffer C, 并加入 100 μ L 42 $^{\circ}$ C 预热的 1 \times Buffer C 温和洗涤 5 min, 吸弃洗涤液。
- 11) 向每个孔中添加 100 μ L 预先稀释的 DAPI 染色溶液, 确保在暗环境中染色 10 min。随后使用移液器小心地去除 DAPI 染色液, 并用 PBS 进行两次洗涤, 每次间隔 5 分钟, 以彻底清除多余的染料。
- 12) 封片时, 在干净的载玻片上小心滴加抗淬灭剂, 用镊子轻轻将细胞爬片的细胞层朝下放在滴加抗淬灭剂的部位, 荧光显微镜下观察并拍摄。

2.10 数据统计与分析

所有数据分析均使用 GraphPad Prism 8.0 进行。除非另有说明, 一般对两组样本之间差异的分析进行双侧 Student T 检验。所有统计数据均以图中的平均数 \pm 标准差表示, $p < 0.05$ 为有统计学意义。

研究结果

1. CircSCAP 具有 circRNA 基本环状特性

基于 circBase 数据库, 我们发现 circSCAP 是一个保守的环状 RNA 结构, 长度为 915 nt, 来源于染色体 chr3: 47466974-47476627 的外显子 3-8 的片段区域。

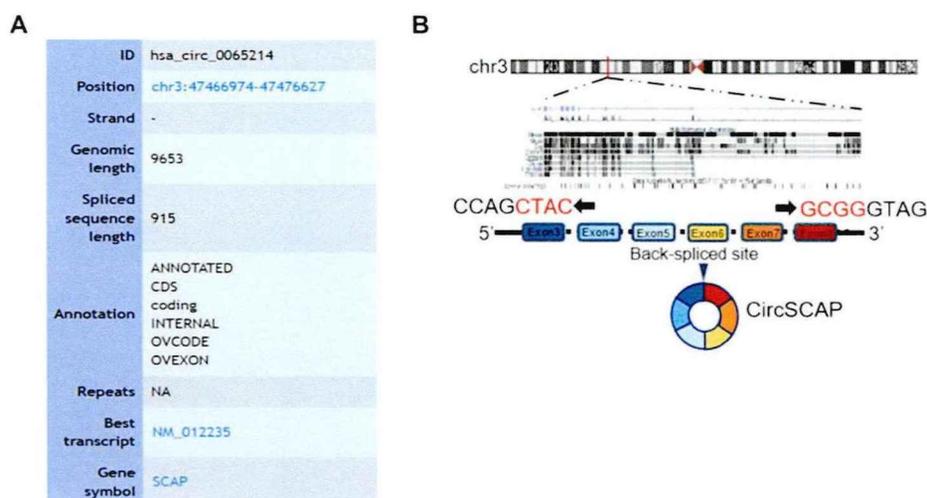


图 4 CircSCAP 的基因组信息

Fig. 4 Genomic information of CircSCAP

(A) CircBase 数据库中 circSCAP 的信息。(B) (上图) 显示基因组中 circSCAP 位点的示意图。(下图) 由外显子 3-8 反向剪接的 circSCAP 示意图。

为确认 circSCAP 的存在，我们针对剪接点进一步设计了发散引物 (Divergent primers) 和收敛引物 (Convergent primers) 以特异性扩增对应 SCAP 的线性和环状 RNA 片段。在来自 MCF-7 和 T47D 细胞的 cDNA 和基因组 DNA (gDNA) 中分别进行 PCR 扩增，扩增产物进行琼脂糖电泳，结果显示，线性 SCAP 可以从 cDNA 和 gDNA 中扩增，而环状 SCAP 只能从 cDNA 中扩增 (图 5A)。放线菌素 D 可以抑制线性 mRNA 的稳定性，我们在处理后提取 MCF-7 和 T47D 细胞中的 RNA 进行扩增，RT-qPCR 结果表明 circSCAP 的半衰期超过 18 小时，远长于线性 SCAP 的半衰期，具有更稳定的结构特征 (图 5B)。RNase R 可以从 3' 到 5' 方向降解线性 mRNA，并消化几乎所有线性 mRNA，在提取的 MCF-7 和 T47D 细胞 RNA 中加入 RNase R 消化后，RT-qPCR 结果显示，circSCAP 比线性 SCAP 更能抵抗 RNase R 的消化 (图 5C)。CircSCAP 转录扩展只能用 Random 6 mer 引物获得，而不能用 Oligo dT 引物获得，而线性 SCAP 转录可以用两种引物同时获得，证明 CircSCAP 缺失 poly A 尾，具有环状特殊结构 (图 5D)。综上所述，我们鉴定了由六个外显子组成的 circSCAP (hsa_circ_0065214) 在激素受体阳性乳腺癌中稳定存在的环状特性。

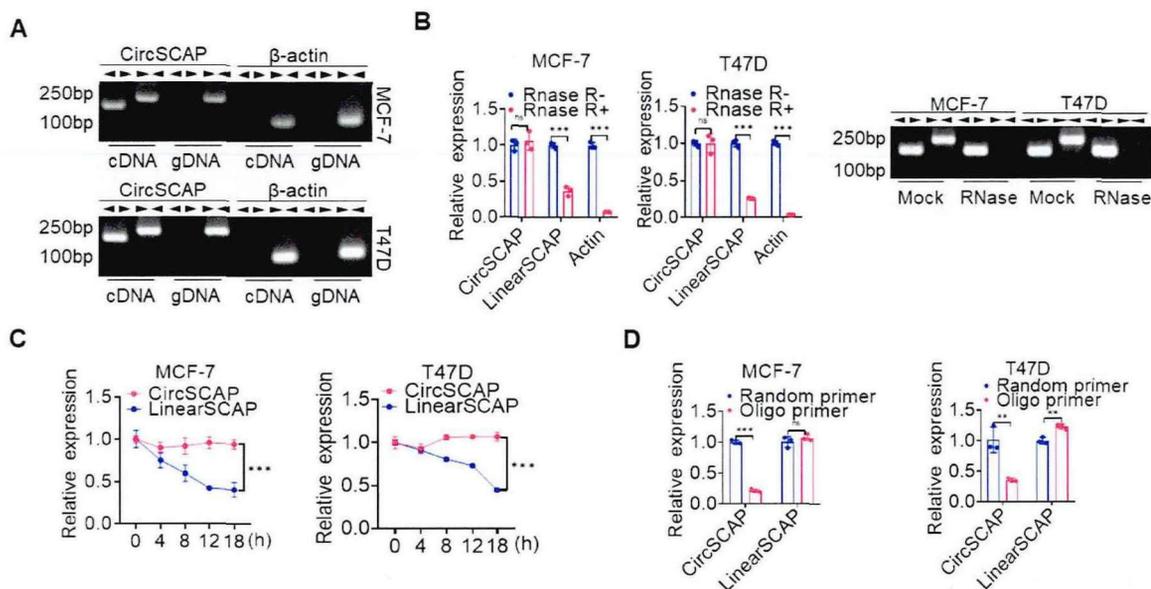


图 5 CircSCAP 环状结构的鉴定

Fig. 5 Identification of circSCAP ring structure

(A) 分别对 MCF-7 和 T47D 细胞的 cDNA 和 gDNA 的 circSCAP 表达水平进行 RT-qPCR 分析，其中 β -actin 用作阴性对照。(B) RT-qPCR 分析和琼脂糖凝胶电泳检测添加 RNase R 后 MCF-7 和 T47D 细胞中 circSCAP 和 linearSCAP 表达水平的变化。(C) RT-qPCR 分析检测使用放线菌素 D 后 MCF-7 和 T47D 细胞中 circSCAP 和 linearSCAP 表达水平的变化。(D) 分别使用 Random 6-mer 引物或 Oligo dT 引物检测反转录后 MCF-7 和 T47D 细胞中扩增的 circSCAP 和 linearSCAP 的量。

2. CircSCAP 主要在细胞核中发挥潜在作用

为了探究 circSCAP 是在细胞质还是细胞核中发挥作用，我们进行了核质分离实验，将分离得到的胞核和质 RNA 进行 RT-qPCR 表达分析，结果显示 circSCAP 主要存在于细胞核中（图 6A）。此外，还设计了一种带有 circSCAP 荧光信号的核酸杂交探针，以显示 circSCAP 的亚细胞定位。我们的荧光原位杂交结果显示，circSCAP 主要存在于 MCF-7 和 T47D 细胞的细胞核中（图 6B），这与核质分离实验的结果一致。以上研究结果表明 circSCAP 主要在激素受体阳性乳腺癌细胞核中发挥潜在作用。

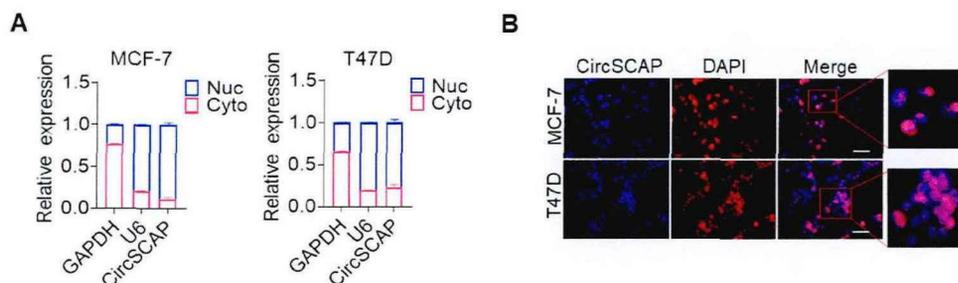


图 6 CircSCAP 的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of circSCAP

(A) RT-qPCR 分析显示 MCF-7 和 T47D 细胞核质分离后 circSCAP 在细胞核和细胞质中的表达差异。(B) RNA-FISH 分析 circSCAP 在 MCF-7 和 T47D 细胞中的分布特征。比例尺, 100 μm 。

第三部分 CircSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌恶性进展的功能研究

研究目的

1. 探究 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞生长增殖、迁移侵袭能力的影响；
2. 探究 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌干性特征的影响。

材料与方法

1. 实验材料

1.1 细胞系

本部分研究中所使用的细胞系同第一部分 1.1

1.2 临床样本

本部分类器官培养采用 2023 年于山东大学齐鲁医院采集的两例激素受体阳性乳腺癌新鲜组织标本。两例患者均在山东大学齐鲁医院接受手术及组织病理检验，均在被充分告知并获得知情同意后，进行组织样本的取材。组织样本均是在 30 分钟之内完成取样、运输、切块、消化等操作，之后当天即开始类器官培养。所有肿瘤组织均经过术后病理证实，确定为激素受体阳性乳腺癌。本研究临床样本的获取遵循国际标准，并已获得山东大学齐鲁医院伦理委员会的正式批准。

1.3 实验试剂

1.3.1 EdU 相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
渗透剂 (Triton X-100)	美国 Sigma-Aldrich 公司	室温
甘氨酸	国药集团化学试剂有限公司	室温
PBS (pH 7.2-7.6)	上海源培生物科技股份有限公司	4°C
4%多聚甲醛 (细胞固定液)	北京索莱宝科技有限公司	4°C
Hoechst 染色液	上海碧云天公司	4°C

1.3.2 克隆形成和 Transwell 实验相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	室温
结晶紫	北京索莱宝公司	室温
基质胶	美国康宁公司	-80°C

1.3.3 蛋白质的提取和浓度测定相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
Western 及 IP 细胞裂解液	上海碧云天公司	4°C
蛋白酶抑制剂 PMSF	上海碧云天公司	4°C
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Milipore 公司	室温避光
5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海翌圣生物科技有限公司	4°C

1.3.4 Western blot 相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺	北京索莱宝公司	4°C
甘氨酸	国药集团化学试剂有限公司	室温
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	室温避光
过硫酸铵 (APS)	美国 Sigma-Aldrich 公司	室温避光
十二烷基硫酸钠 (SDS)	美国 Amresco 公司	室温
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	室温避光
四乙基乙二胺 (TEMED)	北京索莱宝公司	室温避光
一抗稀释液	上海碧云天公司	4°C
山羊抗兔 Western blot 二抗	北京中杉金桥公司	-20°C
山羊抗鼠 Western blot 二抗	北京中杉金桥公司	-20°C
Tween-20	北京索莱宝公司	-20°C
ECL 发光液	南京诺唯赞公司	4°C避光
Actin 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
ACC α 抗体	美国 ImmunoWay 公司	-20°C
p-ACC α 抗体	美国 Santa Cruz 公司	-20°C
FASN 抗体	美国 Santa Cruz 公司	-20°C
SCAP 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司	-20°C
SREBP-1 抗体	美国 Santa Cruz 公司	-20°C
ACLY 抗体	武汉爱博泰克生物科技有限公司	-20°C
SCD 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
CD133 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司	-20°C
CD44 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
CDK4 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
CDK6 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
Cyclin B1 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
Cyclin D1 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C

NANOG 抗体	美国 ImmunoWay 公司	-20°C
GAPDH 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	-20°C
RXRA 抗体	武汉爱博泰克生物科技有限公司	-20°C

1.3.5 干细胞成球试验相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
B27	上海碧云天公司	-20°C
DMEM/F12 培养基	北京 Macgene 公司	4°C
Human Epidermal Growth factor (hEGF)	北京 Macgene 公司	-20°C
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	北京 Macgene 公司	-20°C
Penicillin-Streptomycin	北京 Macgene 公司	4°C
牛胰岛素	北京 Macgene 公司	-20°C

1.3.6 类器官培养相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
R-Spondin 3	美国 R&D 公司	-20°C
DMEM/F12 培养基	北京 Macgene 公司	4°C
Neuregulin 1	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
FGF 7	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
FGF 10	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
EGF	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
Noggin	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
A83-01	美国 Tocris 公司	-20°C
Y-27632	美国 Abmole 公司	-20°C
SB202190	美国 Sigma-Aldrich 公司	-20°C
B27 supplement	美国赛默飞世尔科技有限公司	-20°C
N-Acetylcysteine	美国 Sigma-Aldrich 公司	-20°C
Nicotinamide	美国 Sigma-Aldrich 公司	-20°C
Hepes	美国 Invitrogen 公司	-20°C
Penicillin/Streptomycin	北京 Macgene 公司	4°C
Primocin	北京 Macgene 公司	4°C

1.4 实验耗材

本部分研究中所使用的耗材同第二部分

1.5 溶液配置

1.4.1 10×蛋白转膜缓冲液

试剂	加入量
Glycine	14.4 g
Tris	3.03 g
3DW	定容至 1 L

1.4.2 10×TBS 缓冲液

试剂	加入量
NaCl	80 g
Tris	24.2 g
浓盐酸	15 mL
3DW	定容至 1 L

1.4.3 1×TBST 洗涤液

试剂	加入量
10×TBS 缓冲液	50 mL
Tween-20	0.5 mL
3DW	定容至 500 mL

1.6 主要仪器和设备

名称	公司
移液枪	德国 Eppendorf 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
微型常温离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
低温高速离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
全自动纯水仪	美国 Millipore 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
NanoDrop 2000	美国赛默飞世尔科技有限公司
Western blot 电泳仪	伯乐生命医学产品有限公司
Western blot 蛋白电转槽	伯乐生命医学产品有限公司
恒温培养箱	中国精宏实验设备公司
凝胶成像系统	美国 ProteinSimple 公司
-20℃冰箱	日本松下集团
4℃冰箱	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温干燥箱	明尼苏达矿业与制造公司-美国

液氮罐	美国赛默飞世尔科技有限公司
室温摇床	上海精宏实验设备公司
EnSpire 多功能酶标仪	美国 PerkinElmer 公司-

2. 实验方法

2.1 细胞培养、冻存、复苏

相关实验方法参见第一部分 2.1 - 2.4

2.2 细胞样本总 RNA 提取、反转录及实时定量 PCR 表达分析

相关实验方法参见第一部分 2.4-2.6

2.3 细胞转染

2.3.1 siRNA 转染

靶向 circSCAP 的 siRNAs 购买自吉玛基因，序列如下表所示：

名称	序列
siNC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
si-circSCAP#1	5'-ACCCUCA AUGGCGGCUACCTT-3'
si-circSCAP#2	5'-GGCGGCUACCCACUGCUGATT-3'

我们使用百代生物公司的 Rfect 小核酸转染试剂对实验中的小干扰 RNA 进行转染操作，实现对目标基因的表达调控或沉默，以六孔板为例，具体实验操作步骤如下：

1) 细胞接种：在进行转染操作的前一天，将细胞接种于培养皿中，放入培养箱中过夜，确保细胞密度达到适宜的 30-50% 之间。

2) SiRNA-Rfect 混合物准备：每个转染样品分别标记两个对应的 1.5 mL 离心管，其中一个加入 250 μ L 无血清培养基和 5 μ L siRNA。另一个加入 250 μ L 无血清培养基和 10 μ L Rfect 转染试剂。分别轻轻混匀，室温静置 5min。

3) 室温孵育 5 min 后，轻轻混合均匀 siRNA 稀释液与 Rfect 稀释液，随后室温孵育 20 min。

4) 给将要被转染的细胞换液，替换为新鲜的完全培养基。

5) 将混合物加入细胞培养：轻柔地将混合液逐滴均匀地分配到培养皿的各个孔中，随后轻轻摇动培养板，均匀混合后置于 37°C 培养箱。

6) 培养 6 h 后，给细胞更换新鲜的完全培养基。根据细胞类型，目标基因特性及分析技术不同调整孵育时间以确保最佳敲低效果，已完成后续实验。

7) 其他规格的细胞培养容器转染操作与上述相同，试剂用量如下：

培养板	稀释液体积 (μ L)	siRNA 用量 (μ L)	Rfect 用量 (μ L)	培养基 (μ L)
48-well	2 \times 25	0.5	1	250
24-well	2 \times 50	1	2	500
12-well	2 \times 100	2	4	1000

6-well	2×250	5	10	2500
60 mm	2×500	10	20	5000

2.3.2 质粒转染

本研究使用的质粒空载图谱信息见官网，详细信息如下表所示：

名称	公司	货号	抗性	是否带有 GFP 标签
PLCDH	吉赛生物科技有限公司	GS0103	氨苄青霉素	是
pCMV	上海碧云天公司	D2756	卡那霉素	否

使用 Polyplus-transfection 公司的 JetPrime 阳离子脂质体对实验中的过表达质粒及空白对照进行转染操作，实现对目标基因的表达的上调，以六孔板为例，具体实验操作步骤如下：

1) 细胞接种：转染前一天接种细胞，放入培养箱内培养过夜，使细胞在转染时密度保持到 80%左右。

2) 转染前准备：每个转染样品分别标记一个对应的 1.5 mL 离心管，标记相应的样品及处理。

3) 转染混合物准备：在标记好的 1.5 mL 离心管中，用移液枪将 2 μg DNA 稀释到 200 μL jetPRIME 缓冲液中。使用涡旋振荡器彻底混合 5 s。再次用移液枪加入 4 μL jetPRIME 试剂，重复涡旋操作 1 s。

4) 将装有混合物的离心管在室温下孵育 10 min，同时给细胞更换新的完全培养基。

5) 10 min 后，使用移液枪将转染混合物轻柔均匀滴加到新的完全培养基中。

6) 轻轻地来回和左右摇晃培养板使转染混合物分布均匀，随后将培养板送回 37°C 培养箱中孵育。

7) 培养 6 h 后，给细胞更换新的完全培养基。根据细胞类型所过表达基因本身及分析方法不同决定孵育时间的长短，已完成后续实验。

8) 其他规格的细胞培养容器转染操作与上述相同，试剂用量如下：

培养板	缓冲液体积 (μL)	DNA 用量 (μg)	jetPRIME 试剂 (μL)	培养基 (mL)
48-well	20	0.2	0.4-0.6	1
24-well	50	0.5	1-1.5	0.8
12-well	75	0.8	1.6-2.4	1
6-well	200	2	4-6	2
60 mm	400	4	8-12	5

2.4 4,5-二甲基噻唑蓝盐(MTT)还原法

由于活细胞中的酶能够还原外源的 MTT，使其沉积在细胞中，为了检测细胞存活和生长，我们使用 MTT 方法，具体操作步骤如下：

1) 细胞处理：将预处理的细胞以 1000 个/每孔的密度接种于 96 孔板中，每组样品重复 6 个复孔，以每天一个测量板的量接种 6 天的 96 孔板。并用 PBS 封边。

2) MTT 染色: 第二天, 待其生长至合适的细胞密度, 将其从细胞培养箱取出。在每天固定时间, 在 96 孔板的样本孔中室温避光加入 20 μL 使用 PBS 配置黄色澄清 MTT 溶液, 随后轻轻移回培养箱。

3) 孵育: 进行 6h 的静置后, 肉眼可观察到底部有紫色晶体出现。

4) 溶解晶体: 在每天固定时间, 吸弃 96 孔板的样本孔中的培养基混合物, 室温避光加入 100 μL 的二甲亚砷溶解结晶。

5) 测量吸光度: 摇床低速摇动 96 孔培养板, 直至所有紫色晶体完全溶解。随后使用 Microplate Reader 分别在 OD490 nm 和 OD570 nm 处测量每孔的吸光度。

6) 数据分析: 根据吸光度值计算细胞的代谢活力和增殖情况, 并绘制细胞生长曲线。

2.5 克隆形成实验

为了评估细胞增殖能力, 我们进行克隆形成实验, 具体操作步骤如下:

1) 细胞处理: 将预处理的细胞以 500 个/每孔的密度接种于 6 孔板中, 每组样品重复 3 个复孔。

2) 细胞培养: 每 3 天换液一次, 在培养箱中培养 3-4 周。待培养板中形成肉眼可见的细胞集落时, 停止培养。

3) 细胞固定: 用移液枪吸弃培养液, PBS 洗涤 3 次, 随后甲醇固定 20 min。

4) 细胞染色: 用移液枪吸弃固定液, 加入结晶紫染色 30 min 后, 用流水冲洗掉背景上的结晶紫染色。

5) 克隆观察和计数: 使用 Image J 软件对克隆进行计数和分析, 包括计算克隆数量、大小以及形态等特征。并据此进行各组之间的差异分析, 评估不同处理条件对克隆形成能力的影响。

2.6 EdU 细胞增殖检测实验

EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 用于代替正在复制的 DNA 分子中的胸腺嘧啶, 从而快速检测细胞的 DNA 复制活性。我们使用锐博公司 EdU 检测试剂盒的 Apollo 567 染料, 具体操作步骤如下:

1) 细胞处理: 将预处理的细胞以 10000 个/每孔的密度接种于 96 孔板中, 每组样品重复 3 个复孔。

2) 实验准备: 在实验前准备以下试剂:

试剂	规格
PBS (pH 7.2-7.6)	1 \times
渗透剂 (Triton X-100)	0.5%
甘氨酸溶液	2 mg/mL
多聚甲醛	4%

3) EdU 标记: 将试剂 A 中的 EdU 染色溶液按照 1: 1000 的比例与细胞完全培养基

混合，加入细胞中；在 2 h 的孵育过程结束后，先移除细胞培养液，接着使用 PBS 溶液温和地洗涤细胞两次以去除残留物质。

4) 细胞固定：向孔中加入 50 μL 的细胞固定液（4%的多聚甲醛），在室温下静置 30 min 后移弃；继续加入 50 μL 2 mg/mL 甘氨酸进行中和，室温孵育 5 min 后，移除甘氨酸；用 PBS 洗涤 5 min；随后每孔加入 100 μL 渗透剂，继续摇床孵育 10 min；最后，继续 PBS 洗涤 5 min。

5) Apollo 染色：按照下列表格中的配比，室温避光环境下配置 Apollo 染色反应液，后向每孔加入 100 μL ，并在摇床孵育 30 min 后，小心移除反应液并加入 100 μL 渗透剂洗涤 10 min。

试剂	加入量
缓冲添加剂	5 mg
荧光染料	1.5 μL
催化剂	5 μL
反应缓冲液	25 μL
去离子水	469 μL

6) DNA 染色：室温避光环境下，将试剂 F 以去离子水按 100: 1 的比例稀释，并在确保避光条件下保存；随后，每孔加入 100 μL 染色反应液，置于暗处，静置孵育 30 min，小心移除染色反应液。

7) 图像获取及分析：使用徕卡显微镜拍照并在图像分析软件上合并两个信号通道的图像，计算红色 Apollo 阳性信号与蓝色核染色信号之比以计算增殖率。并据此进行各组之间的差异分析，评估不同处理条件对增殖能力的影响。

2.7 划痕实验

划痕实验是一种常用的细胞迁移和侵袭能力评估方法，具体操作步骤如下：

1) 细胞处理：将预处理的细胞接种于 6 孔板中，数量以贴壁后铺满板底为宜，每组样品重复 3 个复孔。

2) 细胞划痕：细胞铺满板底后，用 10 μL 枪头，垂直于 6 孔板的角度由上到下迅速在中间位置划出一道空白痕迹，尽量保证各个划痕宽度一致。随后用 PBS 冲洗孔板，去除划痕产生的细胞碎片，加入新的完全培养基。

3) 细胞培养：将 6 孔板放回培养箱培养，每隔 8 h 取出进行观察，直至出现明显的划痕愈合现象。

4) 图像获取及分析：使用显微镜对刚划痕 0 h 以及 48 h 后愈合的划痕进行拍照。根据收集的图片中划痕间的距离进行分析，将实验结果量化并进行各组之间的差异分析，评估不同处理条件对迁移能力的影响。

2.8 Transwell 实验

我们使用 Transwell 小室系统和基质胶检测细胞的迁移侵袭能力，具体操作步骤如下：

(1) Transwell 迁移实验

1) Transwell 小室系统准备：将底部有 8 μm 孔径生物膜的 Transwell 小室依次对应放入 24 孔板中。

2) 培养基准备：在 24 孔板与小室底部形成的下室中加入含有 20% 浓度血清的培养基，上室则加入带有细胞悬液的无血清培养基。

3) 细胞准备：将预处理的细胞消化后在无血清培养基中重悬并计数，以每孔 2×10^5 个细胞的细胞数加入 300 μL 无血清培养基中混合均匀。

4) 细胞接种及培养：将细胞混合液轻轻加入上室中，在细胞培养箱中培养 48 小时后，部分细胞迁移到 Transwell 腔室生物膜的下表面。

5) 细胞固定：将 Transwell 小室从 24 孔板中拿出，弃去上室中的细胞和培养基，用 PBS 洗涤三次，用甲醇固定 20 min。

6) 细胞染色：将 Transwell 小室用 PBS 洗涤 3 次后，使用结晶紫染色 20 min。染色结束，用大量蒸馏水洗去结晶紫浮色，将小室倒扣在吸水纸上晾干。

7) 图像获取及分析：将小室重新放回干净的 24 孔板中，使用徕卡显微镜对 Transwell 小室底部染色细胞进行拍摄。根据收集的图片进行分析计数，将实验结果量化并进行各组之间的差异分析，评估不同处理条件对侵袭能力的影响。

(2) Transwell 侵袭实验

侵袭实验和上述迁移实验步骤大致相同，区别在于侵袭实验在上室加入基质胶，肿瘤细胞的基质膜穿越能力通常能反映其在体内侵袭和转移的潜能。具体操作步骤如下：

1) 基质胶铺设：我们提前 24 h 将基质胶放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中缓慢化冻，由固体转变为液体状态，在冰上按 1:7 的比例将基质胶用无血清培养基稀释，随后以 60 μL /孔接种于 Transwell 上室，轻轻移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置 2 h，待液态的基质胶混合物凝结为凝胶状即可使用。

2) 后续操作同上述 Transwell 迁移实验。

2.9 细胞蛋白质的提取和浓度测定

(1) 细胞蛋白质的提取和变性处理

1) 配置裂解缓冲液：将细胞裂解液与 PMSF 以 100:1 的比例，混合均匀制备细胞裂解缓冲液。

2) 裂解细胞：将预处理的细胞从细胞培养箱中取出，吸弃培养基并用 PBS 清洗 3 次，6 孔培养板根据细胞量加入适量裂解缓冲液。

3) 收集细胞：使用细胞刮子轻轻刮下全部贴壁细胞，将含有细胞的裂解液转移到

标记好的 1.5 mL 离心管中，冰浴中静置 30 min 使细胞充分裂解，以 4°C，12000 rpm 转速离心 20 min，收集含有蛋白的上清液。

4) 变性处理：将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中，加入相当于溶液体积 1/4 的 5×溴酚蓝溶液，混匀后放入 95°C 恒温金属浴中加热 10 min，随后置于冰上冷却。

5) 蛋白存储：将变性后的蛋白颠倒混匀后，4°C 离心机中以 10000 rpm 离心 5 min，存放于 -20°C 以备后续使用。

(2) 细胞蛋白质的浓度测定

1) BCA 工作液的准备：根据实验样本数量，室温避光条件配制 BCA 工作液，每个样本使用三个复孔，每个孔加入 200 μL BCA 工作液，比例为 BCA 试剂 A:试剂 B = 50:1，混匀后室温放置。

2) BSA 标准品梯度稀释：使用前将 BSA 标准品 (2 mg/mL) 与 PBS 以体积 1:1 稀释至 1mg/mL，然后取不同体积梯度 (0、2、4、8、12、16、20 μL) 的 BSA 标准品稀释液加入到 96 孔板对照孔中，并用 PBS 补足至 20 μL，以形成不同总蛋白量梯度的混合液。

3) 样品孔配置：将 2 μL 上述获得的蛋白样品加入 96 孔板的实验孔中，每个样品分设三个复孔，并用 PBS 补足到总体积 20 μL。

4) BCA 反应：向对照和试验孔中分别加入 200 μL BCA 工作液，并轻轻放于 37°C 恒温培养箱避光孵育 30 min。

5) OD 值读取：使用酶标仪测定吸光度，将读取数据进行标准曲线计算，由此计算蛋白质浓度，在实验记录本上做好记录。

2.10 Western blot 蛋白印迹分析实验

(1) SDS-PAGE 凝胶配制：

1) 准备配胶模具：使用流动的双蒸水分别洗净 1.5 mm 厚玻璃板和薄玻璃板并在吸水纸上晾干，检查没有异物附着在板子上；将每对厚板和薄板用夹子紧紧卡在配胶架子上，检查并测试水密性。

2) 配置分离胶：按照以下配方表的顺序依次将试剂加入 50 mL 离心管中，混匀小心加入到薄板与厚板之间，沿上面边缘加入 2.5 mL 异丙醇以压平上层分界面，让分离胶静置 30 min 以充分凝固。

试剂	加入量
双蒸水	4 mL
30% Acr-Bis	3.3 mL
Tris-HCl(pH8.8)	2.5 mL
10%APS	100 μL
10%SDS	100 μL
TEMED	4 μL

3) 分离胶凝固后, 倾倒掉异丙醇, 用三蒸水小心清洗 3 次, 去除残留的异丙醇, 并用吸水纸吸干附着的水珠。

4) 配置浓缩胶: 按照浓缩胶配方表的顺序依次将试剂加入 50 mL 离心管中配制, 混匀小心加入到分离胶上层, 并尽快小心插入梳子避免产生气泡, 静置 30 min 待凝固。

试剂	加入量
双蒸水	2.1 mL
30% Acr-Bis	500 μ L
Tris-HCl(pH8.8)	380 μ L
10%APS	30 μ L
10%SDS	30 μ L
TEMED	3 μ L

(2) SDS-PAGE 凝胶电泳:

1) 使用预制的 10 \times 电泳缓冲液稀释配制 1 L 1 \times 电泳缓冲液, 并转移到电泳外槽中。
2) 从配胶架中取下凝胶板, 小心把梳子拔出, 将凝胶板卡到电泳槽中, 在电泳内槽加满 1 \times 电泳缓冲液, 并小心去掉浮沫。

3) 将蛋白 marker 和样品依次加入至凝胶泳道孔底部, 注意动作轻柔缓慢, 切勿因动作幅度太大使蛋白样飘出。

4) 开始以 80V 电压将蛋白样品进行浓缩成一条整齐的线, 需要约 30 min, 当蛋白 marker 开始分离时, 增加电压至 120V 继续在分离胶中电泳, 根据所需要目的蛋白分子量大小至合适位置停止电泳, 需要约 50 min。

(3) 蛋白转印: 采用“夹心法”进行湿转完成凝胶中蛋白的转移。

1) 将 PVDF 膜泡入甲醇中激活, 配置 1 \times 的转膜缓冲液, 将转膜夹子和滤纸提前在转膜液中浸湿。用三蒸水冲洗转膜槽, 确保电极连接处干净无异物。

2) 由上到下依次排列, 转膜夹子黑色面、湿滤纸、凝胶、已激活的 PVDF 膜、湿滤纸、转膜夹子白色面, 排除各层之间的气泡后夹紧, 装载到转膜槽中。在转膜槽中加满 1 \times 的转膜缓冲液。

3) 将转膜槽置入冰盒中进行冰浴, 在转膜槽周围和顶部加满冰块, 确保转膜途中温度不会过高。设置恒流转膜“250mA 3 h”, 具体电流大小和转膜时间根据目的蛋白分子量大小调整。

(4) 封闭: 转膜结束后, 拆开转膜夹子, 短暂看一下转膜是否成功及完整度, 将 PVDF 膜在 5%脱脂牛奶中室温孵育 1 h, 以封闭非特异性结合位点。

(5) 一抗孵育:

- 1) 封闭结束后, 用现配的 TBST 洗涤 PVDF 膜 2 次, 每次在摇床上低速震荡 10 min。
- 2) 按照所需蛋白分子量大小及蛋白 marker 位置对 PVDF 膜进行裁剪。
- 3) 将 PVDF 膜浸入预先制备的一抗稀释液中, 确保整个膜表面被孵育液充分覆盖,

在 4°C 冰箱中平稳放置过夜。

(6) 二抗孵育:

1) 次日, 从一抗孵育液中拿出 PVDF 膜, 注意回收一抗孵育液, 浸入现配的 TBST 中洗涤 3 次, 每次在摇床上低速震荡 10 min。

2) 将 PVDF 膜放入稀释好的二抗孵育液中, 室温低速摇床孵育 2 h。

3) 二抗孵育结束后, 使用新鲜配制的 TBST 缓冲液对 PVDF 膜进行三次洗涤, 每次 10 min。

(7) 蛋白印迹显影:

1) 显影液现配现用, 按照 1:1 的比例将反应液 A 和 B 室温避光配好。

2) 将显影机器预冷到 -20°C, 并把发光板清洁干净, 将 PVDF 膜平整放置于发光板上, 均匀滴加发光液, 并进行成像检测。

2.11 干细胞成球实验

干细胞成球实验, 是一种常用于体外培养癌症干细胞的方法, 旨在体外模拟干细胞在体内自我更新, 形成球状结构的特征, 具体实验操作步骤如下:

1) 细胞处理: 将预处理细胞用胰酶消化后用 PBS 洗涤三遍, 并在无血清 DMEM/F12 培养基中重悬。

2) 细胞接种: 对每个样本的细胞进行计数, 然后以每孔 500 个的细胞的密度在 96 孔悬浮培养板上接种。细胞生长需要补充干细胞培养特制培养基。

3) 细胞计数: 每隔一天观察一次形成干细胞球的数量和大小, 计算成球率和球直径, 将实验结果量化并进行各组之间的差异分析, 评估不同处理条件对成球能力的影响。

2.12 患者来源的乳腺癌类器官培养

本研究所用新鲜乳腺癌组织来源于山东大学齐鲁医院, 经山东大学伦理审查委员会批准。

1) 组织取材: 取直径约 60 mm 的新鲜肿瘤组织, 用手术刀在 6 cm 的培养皿中切碎。

2) 组织消化: 将组织碎片转移到含有消化液的 50 mL 离心管中, 并固定在 37°C 恒温箱中低速震荡 2h, 使组织消化分解。

3) 肿瘤细胞提取: 将 100 μ m 孔径大小的过滤器放置在另一个干净无菌的 50 mL 离心管上, 将消化后的混合物过滤, 过滤后的液体在预冷的 4°C 离心机中 300g 离心 5 min。弃去上清, 将含有肿瘤细胞的沉淀物在洗涤缓冲液中重悬。

4) 去除红细胞: 再次离心后, 加入 TAC 缓冲液裂解红细胞, 直至混合物上清褪去红色变成无色透明。

5) 类器官接种: 提前 24 h 将基质胶放置在 4°C 中融化为液态, 尽可能地吸弃上清, 并将沉淀重悬在足量的基质胶中, 为防止基质胶重新变得粘稠, 这一步在冰上操作, 动作尽量轻柔但快速。为方便细胞接种, 需提前在 37°C 培养箱中预热 48 孔板。将小铁环

接种在对应的孔中。重悬带有细胞悬液的基质胶，并以每孔 50 μL 的悬浮液接种于预热好的 48 孔板上。集中完成后将培养板立刻轻轻放回 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱，等待 1 h 基质胶凝固后，每孔加入 300 μL 新鲜的类器官培养基。

6) 类器官观察与统计：每天对乳腺癌类器官进行观察并拍照，测量类器官直径大小，并进行各组之间的差异分析，评估不同处理条件对类器官生长的影响。

2.13 数据统计与分析

本部分研究的数据分析参见第二部分

研究结果

1. 干扰 circSCAP 显著抑制激素受体阳性乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力

为了探究 circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌中的潜在作用，我们设计了两个靶向 circSCAP 反向剪接点的特定小干扰 RNA 序列（图 7A）。并在 MCF-7 和 T47D 细胞中检测了两条小干扰的干扰效率，RT-qPCR 结果表明两个小干扰均可以有效地干扰 circSCAP 的表达（图 7B）。

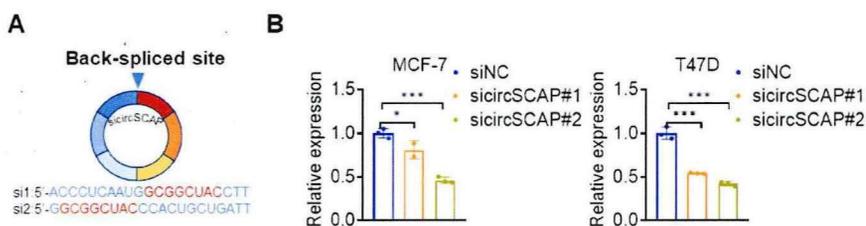


图 7 CircSCAP 的小干扰及干扰效率

Fig. 7 The knockdown efficiency of circSCAP siRNAs

(A) 示意图显示基于反向剪接点设计的两个靶向 circSCAP 的小干扰 RNA。(B) RT-qPCR 分析 MCF-7 和 T47D 细胞中两个小干扰的干扰效率。

为了探究 circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌细胞中具体的生物学功能，我们首先检测了干扰 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞增殖能力的影响。通过 MTT 实验连续观察 5 天细胞的增殖情况，发现抑制 circSCAP 的表达后，MCF-7 和 T47D 细胞的增殖能力明显受到抑制（图 8A），克隆形成实验同样验证了上述结果，干扰 circSCAP 后形成单克隆集落的大小和数量明显降低（图 8B）。EdU 实验是一种细胞增殖实验方法，通常用于评估细胞的 DNA 合成活性，我们使用 EdU 试剂盒检测了 MCF-7 和 T47D 细胞的 DNA 复制和合成能力，结果发现，沉默 circSCAP 后，EdU 标记的信号强度显著降低（图 8C），与经 Western blot 检测的细胞周期相关蛋白（如 Cyclin B1、Cyclin D1、CDK4 和 CDK6）表达变化一致（图 8D）。综合以上结果说明，干扰 circSCAP 显著抑

制激素受体阳性乳腺癌细胞生长增殖能力。

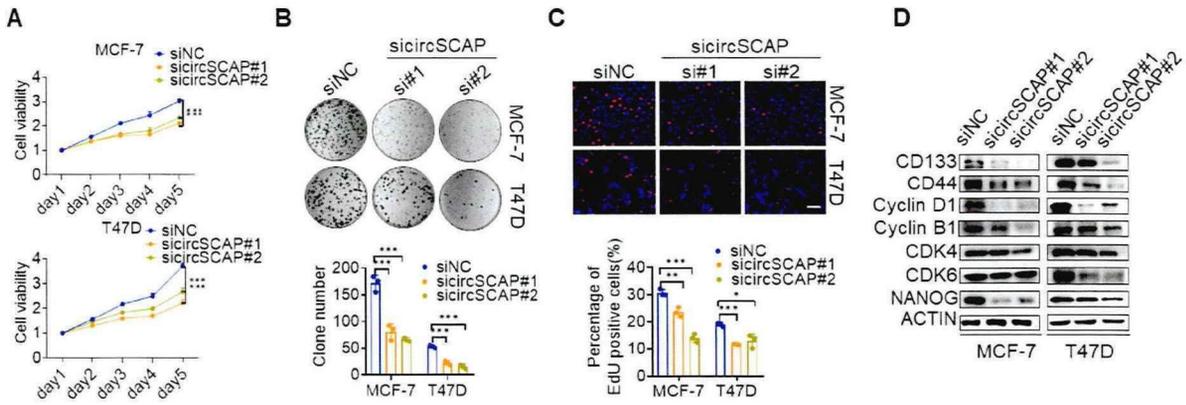


图 8 干扰 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞增殖能力的影响

Fig. 8 Effect of circSCAP interference on proliferation in HR+ breast cancer cells

(A-C) MTT 实验 (A) 克隆形成 (B) 和 EdU 实验 (C) 检测沉默 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 的增殖能力。(D) Western blot 分析 MCF-7 和 T47D 细胞中沉默 circSCAP 后细胞周期和干性标志蛋白的变化。比例尺, 100 μm 。

接着, 我们一方面利用划痕实验检测 circSCAP 的敲低显著降低了激素受体阳性乳腺癌细胞的痕迹愈合能力(图 9A), 另一方面, 敲低 circSCAP 后乳腺癌细胞的 Transwell 共培养系统, 研究结果表明干扰 circSCAP 显著抑制激素受体阳性乳腺癌细胞迁移及侵袭能力(图 9B, 9C)。

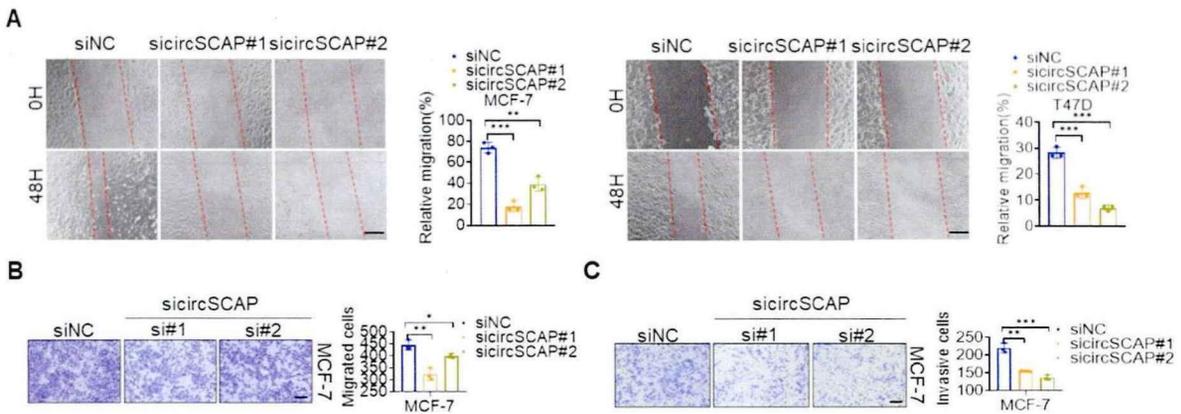


图 9 干扰 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响

Fig. 9 Effect of circSCAP interference on migration and invasion ability in HR+ breast cancer cells

(A-C) 划痕实验 (A) 迁移实验 (B) 基质胶侵袭实验 (C) 检测沉默 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 的迁移侵袭能力。比例尺, 200 μm 。

2.过表达 circSCAP 显著增加激素受体阳性乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力

鉴于干扰 circSCAP 后的影响，我们利用 PLCDH 质粒空白载体，构建了 circSCAP 的过表达质粒，并在 MCF-7 和 T47D 细胞中检测了过表达效率，RT-qPCR 结果表明该质粒可以有效提高 circSCAP 的表达（图 10A）。同样地，我们通过 MTT（图 10B）和克隆形成实验（图 10C）检测癌细胞增殖能力，结果表明 circSCAP 的过表达可以促进 MCF-7 和 T47D 细胞的生长增殖。此外，EdU 实验证明，过表达 circSCAP 会增加 DNA 的复制和合成（图 10D），这与 Western blot 实验中细胞周期相关蛋白的表达变化一致（图 10E）。综合以上结果说明，过表达 circSCAP 显著增加激素受体阳性乳腺癌细胞增殖能力。

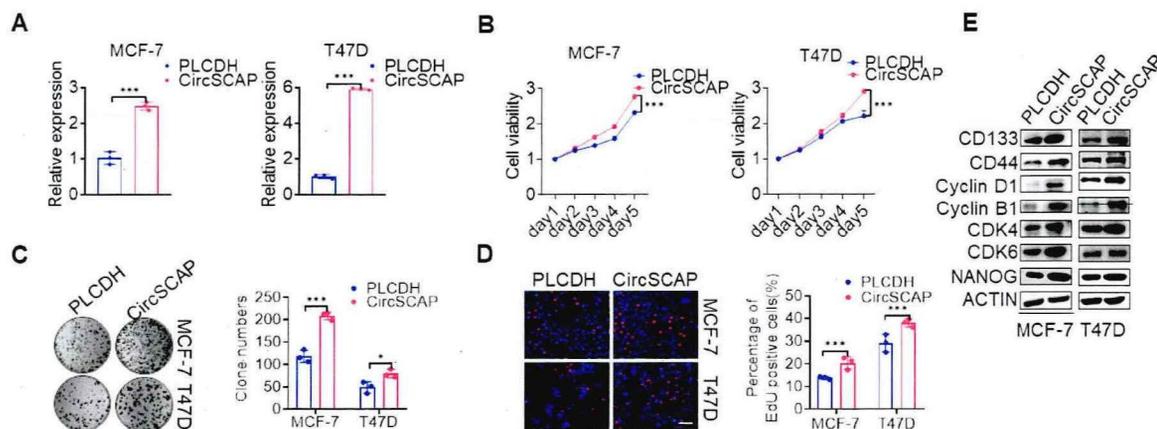


图 10 过表达 circSCAP 的对激素受体阳性乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响

Fig. 10 Effect of circSCAP overexpression on proliferation in HR+ breast cancer cells

(A) RT-qPCR 实验检测 MCF-7 和 T47D 细胞中 circSCAP 过表达效率。(B-D) MTT 实验 (B) 克隆形成 (C) 和 EdU 实验 (D) 检测过表达 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 的增殖能力。(E) Western blot 分析 MCF-7 和 T47D 细胞中过表达 circSCAP 后细胞周期和干性标志蛋白的变化。比例尺，100 μm 。

我们进一步利用划痕实验（图 11A）和 Transwell 系统（图 11B,11C）对激素受体阳性乳腺癌的迁移和侵袭能力进行检测，结果表明 circSCAP 的过度表达增强了激素受体阳性乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

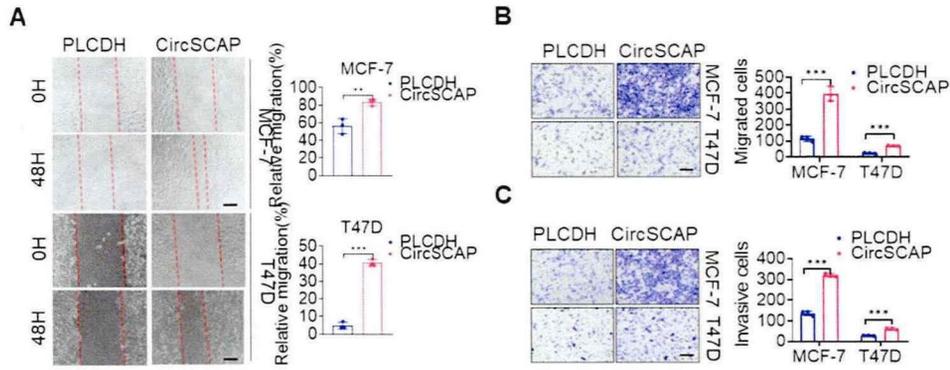


图 11 过表达 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响

Fig. 11 Effect of circSCAP overexpression on migration and invasion ability in HR+ breast cancer cells

(A-C) 划痕实验 (A) 迁移实验 (B) 基质胶侵袭实验 (C) 检测过表达 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 的迁移侵袭能力。比例尺, 200 μm 。

3. CircSCAP 影响激素受体阳性乳腺癌细胞干性能力功能分析

癌症干细胞 (Cancer stem cell, CSC) 具有自我更新、高度转移和肿瘤形成能力, 其在肿瘤的恶性进展中发挥着关键作用。为了探究 circSCAP 是否通过影响细胞干性在乳腺癌恶性进展中发挥作用, 我们首先进行了肿瘤干细胞成球试验, 使用特定培养基培养 MCF-7 和 T47D 细胞来源的成球干细胞, 并转染小干扰组的 siNC, sicircSCAP#1, sicircSCAP#2 和过表达质粒组的 PLCDH, circSCAP, 随后对成球直径大小和球体形成率进行测量记录, 统计分析结果表明, 干扰 circSCAP 抑制了 MCF-7 和 T47D 细胞的球体大小和球体形成率 (图 12A), 相反, 过表达 circSCAP 则有效增加形成的球体大小和球体形成率 (图 12B)。患者来源的乳腺癌类器官 (Patient-derived breast cancer organoids, PDOs) 是在体外模拟器官三维结构和生理功能的评价模型, 能够很好地代表癌细胞的自我更新、分化和自组织能力。我们随机选取在山东大学齐鲁医院手术的两例激素受体阳性乳腺癌患者新鲜乳腺癌组织进行培养, 使用 circSCAP 的 siRNA 转染 48 小时后对观测的类器官直径进行统计分析, 发现抑制 circSCAP 显著降低肿瘤干细胞的生长大小 (图 12C)。最后我们通过 Western blot 分析验证干性标志物的表达水平, 结果显示干扰 circSCAP 后 CD133、CD44 和 NANOG 的蛋白水平下降 (图 8D), 相反, 过表达 circSCAP 后, 表达水平升高 (图 10E)。综上所述, circSCAP 的通过提高癌细胞干性能力来促进激素受体阳性乳腺癌的恶性进展。

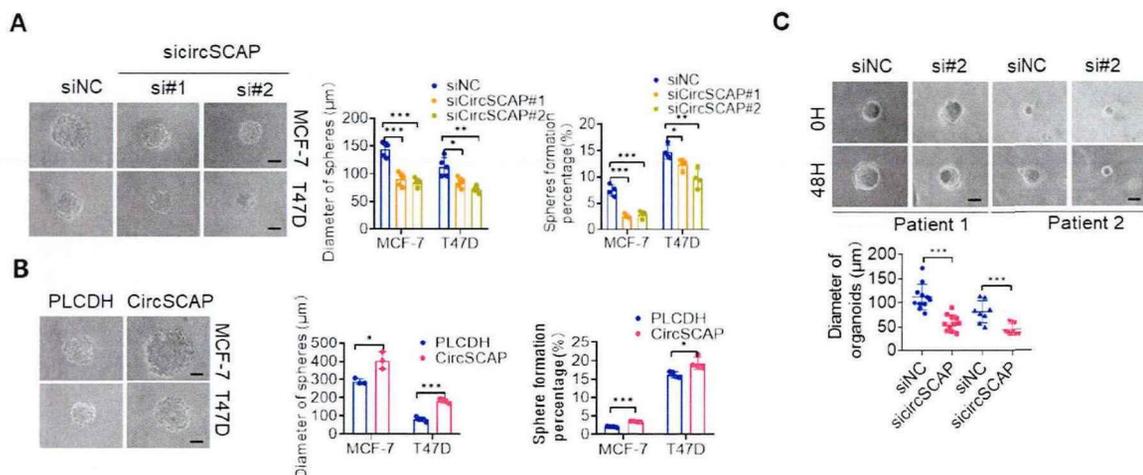


图 12 CircSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞干性自我更新的影响

Fig. 12 Effect of circSCAP on stem cells of hormone receptor-positive breast cancer cells

(A-B) 干细胞成球实验评估沉默和过表达 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 细胞的干性能力。右图是球体形成效率和球体直径大小的统计图。比例尺，50 μm 。(C) 建立来自激素受体阳性乳腺癌患者的类器官模型，并敲除 circSCAP。转染 0 h 和 48 h 后对类器官的大小进行统计评估。比例尺，50 μm 。

第四部分 CircSCAP 促进脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌恶性进展的功能研究

研究目的

1. 探究 circSCAP 对脂肪酸从头合成的影响；
2. 探究 circSCAP 对脂肪酸存储的影响；
3. 探究 circSCAP 对脂肪酸氧化分解的影响；
4. 探究 circSCAP 是否通过影响脂肪酸代谢重编程改变激素受体阳性乳腺癌干性特征；
5. 探究 circSCAP 是否通过影响脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌进展转移。

材料与方法

1. 实验材料

1.1 细胞系

本部分研究中所使用的细胞系同第一部分 1.1

1.2 临床样本

本部分研究中所使用的临床样本同第三部分 1.2

1.3 实验试剂

1.3.1 脂滴分析实验相关实验试剂

实验试剂	公司	储存条件
油红 O 染色粉末	美国 Sigma-Aldrich 公司	室温避光
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	室温避光
苏木精染色液	北京索莱宝科技有限公司	室温避光
1%酒精盐酸	北京索莱宝科技有限公司	室温避光
氨水	北京索莱宝科技有限公司	室温避光
C75	上海宏叶生物科技有限公司	-20°C避光
Bodipy 493/503	上海宏叶生物科技有限公司	-20°C避光
Hochest	北京索莱宝科技有限公司	-20°C避光

1.3.2 脂肪酸氧化相关实验试剂

实验试剂	公司	储存条件
线粒体分离实验	上海碧云天公司	-20°C
脂肪酸氧化速率比色法检测试剂盒	上海杰美基因医药科技有限公司	室温避光
Hochest	北京索莱宝科技有限公司	-20°C避光

1.4 实验耗材

本部分研究中所使用的实验耗材同第三部分 1.3

1.5 溶液配置

1.6 主要仪器和设备

名称	公司
移液枪	德国 Eppendorf 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
微型常温离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
低温高速离心机	美国赛默飞世尔科技有限公司
全自动纯水仪	美国 Millipore 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
NanoDrop 2000	美国赛默飞世尔科技有限公司
Western blot 电泳仪	伯乐生命医学产品有限公司
Western blot 蛋白电转槽	伯乐生命医学产品有限公司
恒温培养箱	中国精宏实验设备公司
凝胶成像系统	美国 ProteinSimple 公司
正置荧光显微镜	德国 Leica 公司
倒置荧光显微镜	日本 Olympus 公司
手动正置显微镜	日本尼康株式会社公司
-20°C冰箱	日本松下集团
4°C冰箱	美国赛默飞世尔科技有限公司
恒温干燥箱	明尼苏达矿业与制造公司-美国
液氮罐	美国赛默飞世尔科技有限公司
室温摇床	上海精宏实验设备公司
EnSpire 多功能酶标仪	美国 PerkinElmer 公司-

2. 实验方法

2.1 细胞培养、冻存、复苏

相关实验方法参见第一部分 2.1-2.3

2.2 细胞样本总 RNA 提取、反转录及实时定量 PCR 表达分析

相关实验方法参见第一部分 2.4-2.6

2.3 Western blot 蛋白印迹分析实验

相关实验方法参见第一部分 2.10

2.4 脂滴分析实验

2.4.1 油红 O 染色

1) 细胞处理: 提前将细胞爬片放置在 24 孔板中, 将预处理的细胞用胰酶消化后以 60-70% 的密度接种于细胞爬片上。轻轻放回 37°C 细胞培养箱中, 待细胞贴壁。

2) 细胞固定: 吸弃细胞培养基, 用 PBS 清洗 3 次细胞爬片后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, PBS 清洗 3 次。

3) 染色液配置: 配置油红 O 原液, 将 0.5g 油红 O 粉末溶于 100 mL 异丙醇中, 使其终浓度为 5 mg/mL, 避光 4°C 保存。

4) 细胞润洗: 吸弃 PBS, 用蒸馏水稀释的 60% 异丙醇平衡 5 min。

5) 脂滴染色: 每个细胞爬片在油红 O 染色液中 37°C 避光孵育染色 1 h, 然后用 PBS 洗涤 2 次。随后将细胞爬片在 60% 异丙醇中浸润 1 min 洗去浮色。

6) 细胞核染色: 使用苏木精孵育 5 min, 用 PBS 冲洗 1 次后, 紧接着 1% 盐酸酒精分化 3 s 后氨水反蓝 2 min。

7) 封片: 用吸水纸吸去周边水分, 使用甘油明胶封片剂, 在载玻片中间滴一滴甘油明胶, 迅速用镊子夹起细胞爬片倒扣在载玻片上, 置于室温避光处晾干。

8) 图像获取及分析: 将载玻片放置在 Leica 显微镜载物台上, 观察脂滴染色情况, 低倍镜下找到较好视野, 换高倍镜进行拍摄。根据收集的图片进行分析计数, 将实验结果量化并进行各组之间的差异分析, 评估不同处理条件对脂滴的影响。

2.4.2 Bodipy 493/503 染色

1) 细胞处理: 同油红 O 染色细胞处理方法, 待细胞贴壁后进行下一步。

2) 制备染色工作液: 在避光室温的环境下, 使用 PBS 稀释 5 mM 染色原液, 制备终浓度为 2 μ M 的 BODIPY493/503 染色工作液。要注意先染色再固定, 不然非特异染色很高。

3) 细胞染色: 吸弃培养液后, 用 PBS 缓冲液轻轻地清洗细胞两次。向培养皿中加入 1 mL 染色工作液, 避光孵育 15 min。为降低非特异性染色风险, 请务必先进行染色再进行固定。从这一步开始, 所有实验操作均应在避光条件下进行。

4) 细胞固定: 吸弃染色液, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次, 室温环境下, 将细胞固定在 1 mL 4% 多聚甲醛中 30 min。

5) 细胞核染色: 吸弃 4% 多聚甲醛, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次, 在室温避光环境下, 使用 Hoechst 染色细胞核。再次使用 PBS 洗涤细胞。

6) 图像获取及分析: 载玻片可保存在 4°C 或立即成像, 成像时, 观察脂滴荧光染色情况, 该荧光探针容易淬灭, 请务必在暗室拍摄并减少荧光照射玻片的时间。根据收

集的图片进行分析计数，将实验结果量化并进行各组之间的差异分析，评估不同处理条件对脂滴的影响。

2.5 线粒体分离试验

1) 溶液准备：初次使用时，将 PMSF 溶剂逐滴滴入 PMSF 晶体中，确保充分混匀。已配制好的 PMSF 溶液应保存在 -20°C 。

2) 收集细胞：将预处理的贴壁细胞，轻轻用 PBS 洗涤一遍，随后用胰酶消化细胞，室温条件下，设置 150 g 离心 10 min 以收集细胞沉淀。

3) 洗涤细胞：使用冰上预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀后准备用细胞计数板计数。

4) 预处理：按 2000 万细胞/mL 的比例调整细胞浓度，加入线粒体分离试剂，轻轻混匀细胞，冰上静置 15 min 。

5) 细胞匀浆：将上述细胞悬液转移至玻璃匀浆器中，轻轻匀浆约 25 次左右，以确保细胞膜充分破碎。

6) 匀浆效果的鉴定：使用台盼蓝染色评估匀浆效果，比如在进行 10 次匀浆后取约 $2\text{ }\mu\text{L}$ 细胞匀浆与 $40\text{ }\mu\text{L}$ 台盼蓝染色液，用移液枪混匀后，将一滴混合液置于载玻片上，通过显微镜检查，观察被染成蓝色（即台盼蓝染色阳性）细胞的比例。如果发现染色阳性细胞比例低于 50% ，应增加匀浆操作次数。每次增加匀浆次数后，重复染色和观察步骤。当染色阳性比例超过 50% 时，说明匀浆效果理想，可以停止匀浆并进行后续实验。

7) 梯度离心：把上述细胞匀浆以 600 g 转速，在 4°C 离心 10 min 。离心结束后，小心把上清转移到另一离心管中，再次以 $11,000\text{ g}$ 转速， 4°C 离心 10 min 。接着仔细去除离心后的上清液。留下的沉淀物即为所要分离的细胞线粒体。

8) 线粒体储存：将得到的完整线粒体加入线粒体储存液，重悬后进行储存。

2.6 脂肪酸氧化速率比色法检测

脂肪酸 β -氧化速率比色法检测试剂是测定线粒体裂解样品中脂肪酸 β -氧化速率经典的技术方法。该方法基于棕榈酰肉碱氧化依赖性铁还原，通过监测单位时间内还原产物浓度的减少，以比色法来量化脂肪酸 β -氧化的速度。本实验使用 GENMED 脂肪酸氧化速率比色法检测试剂盒，具体实验操作步骤如下：

(1) 测定准备

1) 将纯化的完整线粒体从冰箱中拿出，置于冰盒中融化备用。

2) 开启并设定分光光度仪，设定波长 420 nm 和 470 nm ，间隔 1 min ，读数 6 次，共计测定时间 5 min 。

3) 从 -20°C 中取出各组分试剂，置于冰盒中融化备用，尤其注意底物液 A 和底物液 B 避光保存，但缓冲液 A 需在室温下平衡。

(2) 背景对照测定

1) 同样的实验只需测定一次背景对照，依次在比色皿中加入 $750\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液 A、 100

μL 反应液 B、50 μL 底物液 A、50 μL 底物液 B，上下轻柔颠倒 5 次混匀后在 25°C 温度下避光孵育 3 min。

2) 3 min 后，加入 50 μL 阴性液 E，同样但要更快速地上下轻柔颠倒混匀。快速放进分光光度仪中检测，读数为背景空对照。

(3) 样品测定

1) 与背景对照测定相同，依次在比色皿中加入 750 μL 缓冲液 A、100 μL 反应液 B、50 μL 底物液 A、50 μL 底物液 B，上下轻柔颠倒 5 次混匀后在 25°C 温度下避光孵育 3 min。

2) 3 min 后，加入 50 μL 澄清无杂质的待测样品，在 3 秒内快速颠倒混匀，即刻放进分光光度仪中检测，读数为样品读数。

(4) 氧化速率计算

1) 背景空对照 = $(\text{OD}_{420} - \text{OD}_{470})_{0 \text{ min}} - (\text{OD}_{420} - \text{OD}_{470})_{5 \text{ min}}$

2) 样品读数 = $(\text{OD}_{420} - \text{OD}_{470})_{0 \text{ min}} - (\text{OD}_{420} - \text{OD}_{470})_{5 \text{ min}}$

3) 氧化速率的计算单位为微摩尔铁氰化物还原/分钟/毫克，计算过程如下：[(样品读数 - 背景读数) \times 1 (体系容量; 毫升)] \div [0.5 (样品蛋白量; 毫克) \times 105 (毫摩尔吸光系数) \times 5 (反应时间; 分钟)]

2.7 数据统计与分析

本部分研究的数据分析参见第二部分。

研究结果

1. CircSCAP 促进脂肪酸从头合成途径

如前所述，乳腺细胞癌变后，脂肪酸合成途径重新激活，在癌细胞进程中发挥了重要作用，脂肪酸从头合成途径在正常组织与癌症组织中的重要性不同，使其成为一个有吸引力的研究方向，为了深入探讨 circSCAP 对脂肪酸代谢的影响，我们首先着眼于脂肪酸从头合成途径，通过 Western blot 实验检测脂肪酸从头合成途径的关键酶的表达水平，干扰 circSCAP 的表达后，参与脂肪酸从头合成的关键分子的表达水平下降（图 13A），过表达后则相反（图 13B），该结果表明 circSCAP 的表达水平与脂肪酸从头合成途径呈正相关。总结以上结果，激素受体阳性乳腺癌异常表达的 circSCAP 促进脂肪酸的从头合成。

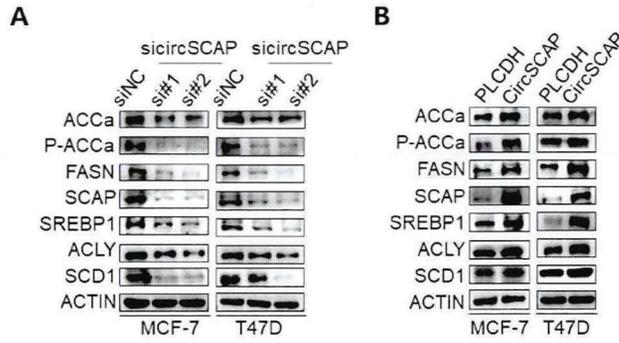


图 13 CircSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞脂肪酸从头合成的影响

Fig. 13 Effect of circSCAP on de novo fatty acid synthesis in HR+ breast cancer cells

(A-B) Western blot 实验分析沉默 (A) 及过表达 circSCAP 后 (B) MCF-7 和 T47D 细胞中脂肪酸合成相关蛋白的表达变化。

2.CircSCAP 对脂肪酸存储的影响

脂肪酸存储是指人体内多余的能量以三酸甘油酯的形式存储在脂滴中的过程。癌细胞内积累的脂滴不仅有助于维持脂质平衡和避免脂质毒性，同时还能作为能量来源，释放 ATP 和氢离子，以支持细胞的生存和功能，在癌细胞进展中具有重要作用。为了深入探讨 circSCAP 对脂肪酸存储的影响，一方面我们在 MCF-7 和 T47D 细胞中进行了 circSCAP 的沉默和过表达，油红 O 染色结果表明，干扰 circSCAP 导致细胞质内脂滴积累的红色染色面积减少 (图 14A)，而过表达 circSCAP 则产生相反的效果 (图 14B)，另一方面，一种更敏感的荧光标记染料 Bodipy 493/503，与细胞内的中性脂质 (如脂滴) 相结合时，会发出绿色荧光信号，染色结果如图，脂滴的多少随着 circSCAP 的减少或增加而发生相应正相关变化趋势 (图 14C-D)。总结以上结果，激素受体阳性乳腺癌异常表达的 circSCAP 促进脂肪酸的存储累积。

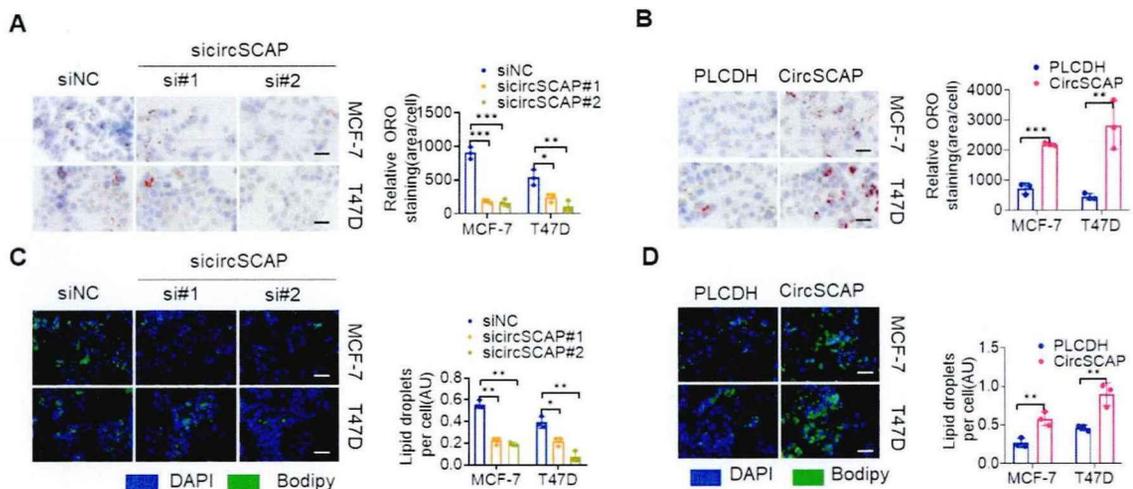


图 14 CircSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞脂肪酸存储的影响

Fig. 14 Effect of circSCAP on fatty acid storage in HR+ breast cancer cells

(A) 油红 O 染色和 (C) Bodipy 493/503 染色分析沉默 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 细胞中脂滴的形成变化。(B) 油红 O 染色和 (D) Bodipy 493/503 染色分析过表达 circSCAP 后 MCF-7 和 T47D 细胞中脂滴的形成变化。比例尺, 50 μm 。

3.CircSCAP 对脂肪酸氧化分解的影响

脂肪酸分解是指人体对脂质的利用过程, β -氧化是脂肪代谢中重要的氧化途径, 包括脂肪酸进入线粒体内, 被 β -氧化系统逐渐氧化分解为二氧化碳和水的过程。脂肪酸氧化速率比色法检测试剂盒是一种用于测定脂肪酸氧化速率的试剂盒, 我们在 MCF-7 和 T47D 细胞中, 沉默或者过表达 circSCAP 后, 分离出细胞中的线粒体进行氧化速率检测, 结果表明, 干扰 circSCAP 增加脂肪酸氧化的速率 (图 15A), 而过表达 circSCAP 后则相反 (图 15B)。总结以上结果, 激素受体阳性乳腺癌异常表达的 circSCAP 抑制脂肪酸的氧化分解速率。

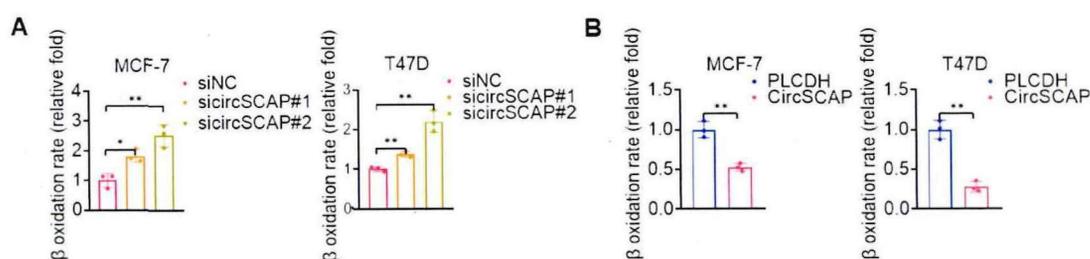


图 15 CircSCAP 对激素受体阳性乳腺癌细胞脂肪酸 β -氧化的影响

Fig. 15 Effect of circSCAP on fatty acid β -oxidation in HR+ breast cancer cells

(A-B) 脂肪酸氧化速率测定分析沉默 (A) 及过表达 circSCAP (B) 后 MCF-7 和 T47D 细胞中脂肪酸氧化速率的变化。

4.CircSCAP 促进脂肪酸代谢重编程改变激素受体阳性乳腺癌干性特征

大量报道显示脂肪酸代谢在维持癌症干细胞特性方面具有突出的作用, 使其成为有吸引力的研究方向和治疗靶点。为了深入研究脂肪酸代谢物改变对激素受体阳性乳腺癌干性特征的影响, 我们使用靶向脂肪酸合成的抑制剂 C75 来抑制脂肪酸合成进程以观测干性能力的变化。首先, 我们通过油红 O 染色和 BODIPY493/503 染色来验证 C75 对脂肪酸合成的影响, 在 PLCDH 组和过表达 circSCAP 组中分别加入对照和 C75, 染色结果表明, 在 MCF-7 和 T47D 细胞中, C75 可以抑制由 circSCAP 表达增加引起的脂肪酸代谢增加 (图 16A-B)。同时, 进行 Western blot 蛋白分析以评估从头脂肪酸合成途径的关键合成酶的变化, 实验结果表明在 MCF-7 和 T47D 细胞中, C75 可以抑制由 circSCAP

表达增加引起的脂肪酸从头合成增加（图 16C）。接着，我们在 MCF-7 和 T47D 细胞中进行同样处理和分组，检测脂肪酸氧化速率变化，数据分析结果发现，C75 可以改善由 circSCAP 表达增加引起的脂肪酸氧化分解速率减慢（图 16D）。

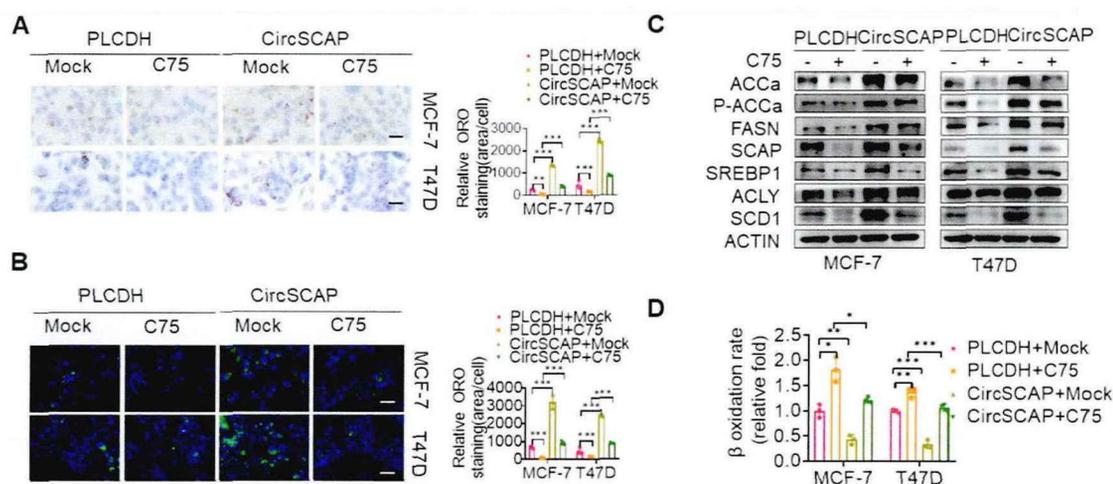


图 16 加入抑制剂 C75 后 circSCAP 的对脂肪酸代谢的影响

Fig. 16 Effect of circSCAP on fatty acid metabolism after adding C75 inhibitor

(A-B) 油红 O 染色 (A) 和 Bodipy 493/503 染色 (B) 分析过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75, MCF-7 和 T47D 细胞中脂滴的形成变化。比例尺, 50 μm。(C) Western blot 分析检测过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75, 脂肪酸合成相关的蛋白质改变。(D) 过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75, MCF-7 和 T47D 细胞中脂肪酸氧化速率的变化。

其次，为了检测癌细胞干性能力的变化，我们将抑制剂 C75 添加到 MCF-7 和 T47D 细胞 PLCDH 组和过表达 circSCAP 组成球的干细胞中，并统计分析肿瘤球的大小和成球率的改变，发现 C75 抑制脂肪酸代谢的同时，抑制癌细胞成球的能力（图 17A）。我们进一步培养了激素受体阳性乳腺癌患者来源的类器官，这些类器官在过表达 circSCAP 后自我更新扩展的球体体积同样被 C75 抑制（图 17B）。对于干性标志蛋白“CD133、CD44 和 NANOG”进行 Western blot 蛋白印迹分析结果表明，C75 有效减弱了 circSCAP 的干性促进作用（图 17C）。综合以上结果表明，circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌中促进脂肪酸代谢重编程和癌细胞干性的串联作用。

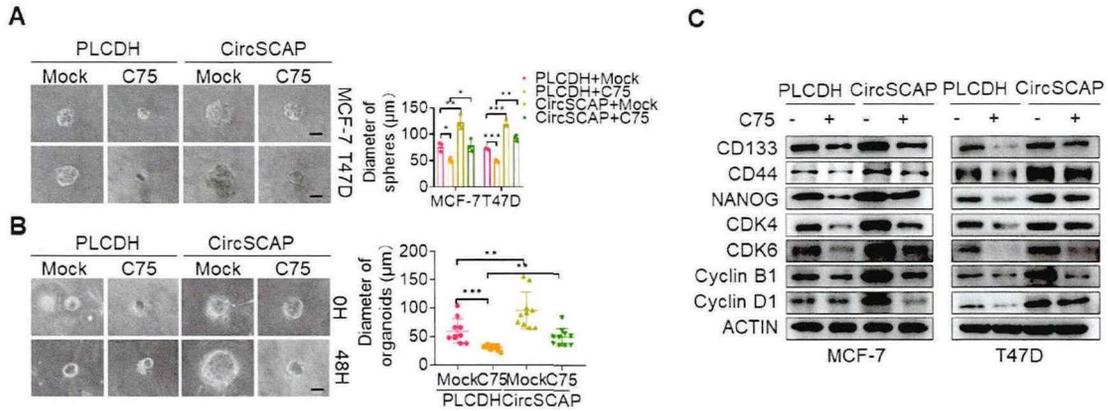


图 17 加入抑制剂 C75 后 circSCAP 的对癌细胞干性的影响

Fig. 17 Effect of circSCAP on cancer stem cells after adding C75 inhibitor

(A) 干细胞成球实验检测在 MCF-7 和 T47D 细胞中过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75 对癌细胞干性能力的影响。比例尺，50 μm。(B) 激素受体阳性乳腺癌患者来源的类器官模型，培养后过表达 circSCAP 同时加入抑制剂 C75，检测对类器官生长能力的影响。比例尺，50 μm。(C) Western blot 分析检测过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75，细胞周期和干性标志蛋白质的改变。

5. CircSCAP 通过促进脂肪酸代谢重编程影响激素受体阳性乳腺癌恶性进展

为了探究 circSCAP 促进脂肪酸代谢重编程对激素受体阳性乳腺癌的影响，我们利用抑制剂 C75 进行了一系列表型实验。首先，我们通过 MTT 实验（图 18A）和 EdU 实验（图 18B），过表达 circSCAP 后加入 C75，检测乳腺癌细胞生长增殖能力，结果表明，C75 抑制脂肪酸代谢可以减弱 circSCAP 对乳腺癌生长增殖的促进作用。接着，细胞周期相关蛋白的 Western blot 分析结果与之一致。最后，我们通过划痕实验（图 18D）和 Transwell 实验（图 18C）对乳腺癌细胞迁移侵袭能力进行检测，发现 C75 抑制脂肪酸代谢同时也可以削弱 circSCAP 对乳腺癌侵袭的促进作用。总之，以上结果表明 circSCAP 通过促进脂肪酸代谢重编程增进激素受体阳性乳腺癌恶性表型的作用。

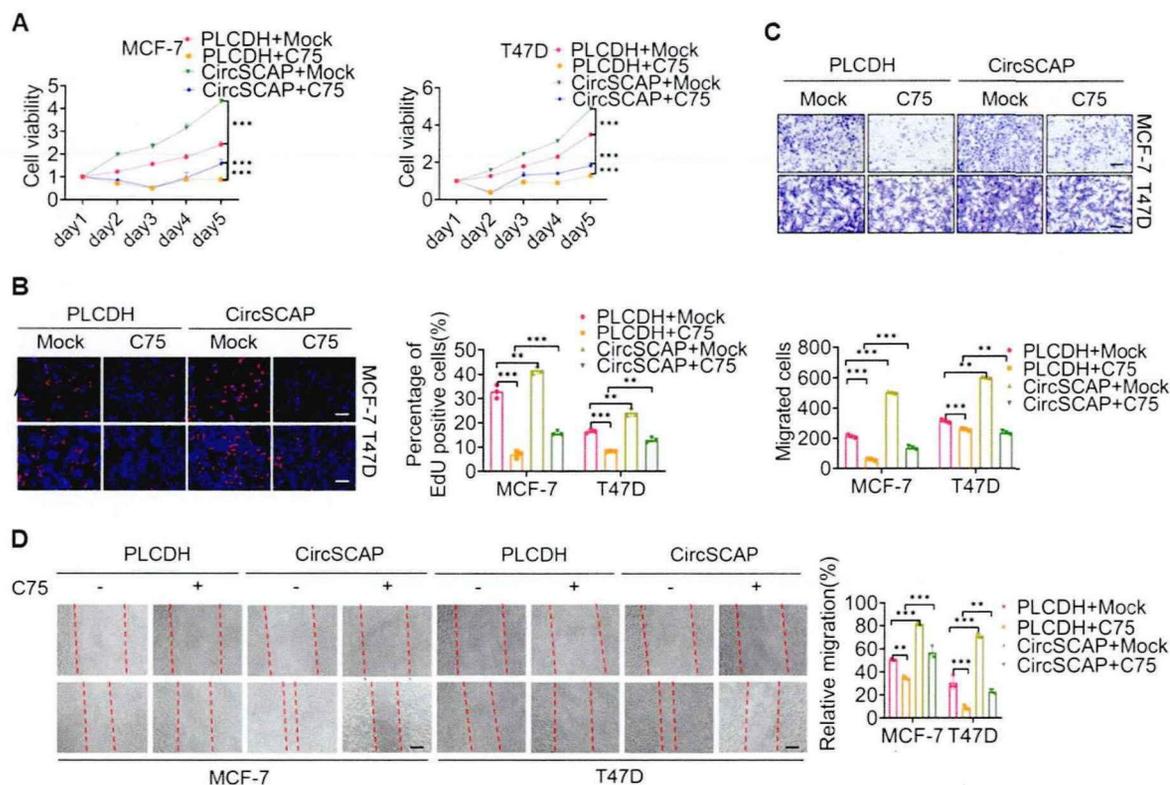


图 18 加入抑制剂 C75 后 circSCAP 的对激素受体阳性癌细胞恶性进展的影响

Fig. 18 Effect of circSCAP on malignant progression after adding C75 inhibitor in HR+ breast cancer cells

(A-B) MTT (A) 和 EdU 实验 (B) 检测 MCF-7 和 T47D 细胞中过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75 对癌细胞生长增殖能力的影响。比例尺, 100 μm 。(C-D) Transwell 实验 (C) 和划痕实验 (D)检测 MCF-7 和 T47D 细胞中过表达 circSCAP 后加入抑制剂 C75 对癌细胞迁移侵袭能力的影响。比例尺, 200 μm 。

第五部分 CircSCAP 调控 SCD1 介导的脂肪酸代谢影响激素受体阳性 乳腺癌恶性进展的分子机制

研究目的

1. 筛选 circSCAP 的下游作用靶点；
2. 探究 circSCAP 对 SCD1 的影响及分子作用机制；
3. 阐明 circSCAP 通过影响 SCD1 调控脂肪酸代谢重编程的功能；
4. 阐明 circSCAP 通过影响 SCD1 调控激素受体阳性乳腺癌细胞恶性进展的功能。

材料与方法

1. 实验材料

1.1 细胞系

本部分研究中所使用的细胞系同第一部分 1.1

1.2. 实验试剂

1.2.1 RNA Pull down 实验及质谱分析相关实验试剂

实验试剂	公司	储存条件
Ambion MAXIscript SP6/T7 试剂盒	美国赛默飞世尔科技公司	4°C避光
RNA Pull down 试剂盒	美国赛默飞世尔科技公司	4°C避光
快速银染试剂盒	碧云天生物科技有限公司	室温避光

1.2.2 表达载体构建相关实验试剂

实验试剂	公司	储存条件
氨苄青霉素 (Ampicillin)	北京索莱宝公司	4°C
卡那霉素 (kanamycin)	北京索莱宝公司	4°C
琼脂糖 (Regular Agarose)	西班牙 BIOWEST 公司	室温
YeaRed Nucleic Acid Gel Stain	上海翌圣生物科技有限公司	4°C
DNA Ladder	北京天根有限公司	4°C
6×DNA loading buffer	南京诺唯赞公司	4°C
酵母提取物 (Yeast Extract)	英国 OXOID 公司	室温
胰蛋白胨 (Tryptone)	英国 OXOID 公司	室温
DH5α 感受态菌	北京天根有限公司	-80°C

甘油	北京索莱宝公司	室温
T4 DNA 连接酶及缓冲液	北京天根有限公司	-20°C
内切酶及缓冲液	北京 NEB 公司	-20°C
DNA 纯化回收试剂盒	北京天根有限公司	室温
无内毒素质粒大提试剂盒	北京天根有限公司	室温
PrimeStar HS DNA polymerase	Takara 宝日医生物技术有限公司	-20°C
2×Taq PCR Mastermix	上海碧云天公司	-20°C

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验相关试剂

实验试剂	公司	储存条件
双萤光素酶报告基因检测试剂盒	美国赛默飞世尔科技公司	-80°C避光

1.3 实验耗材

本部分研究中所使用的细胞系同第四部分

1.4 溶液配置

1.4.1 LB 液体培养基配置

试剂	加入量
酵母提取物	1.25 g
氯化钠	2.5 g
胰蛋白胨	2.5 g
3DW	定容至 250 mL

1.4.2 LB 固体培养基配置

试剂	加入量
酵母提取物	1.25 g
氯化钠	2.5 g
胰蛋白胨	2.5 g
Agarose	4 g
3DW	定容至 250 mL

1.5 主要仪器和设备

本部分研究中所使用的细胞系同第四部分

2. 实验方法

2.1 细胞培养、冻存、复苏

相关实验方法参见第一部分 2.1-2.3

2.2 细胞转染

相关实验方法参见第三部分 2.3，本部分研究涉及小干扰序列如下表所示：

名称	序列
siNC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
siCircSCAP#1	5'-ACCCUCA AUGGCGGCUACCTT-3'
siCircSCAP#2	5'-GGCGGCUACCCACUGCUGATT-3'
siSCD#1	5'-GCACAUCAACUUCACCACATT-3'
siSCD#2	5'-GAGAU AAGUUGGAGACGAUUU-3'
siRXRA	5'-UCGUCCUCUUUAACCCUGACUCCAA-3'

2.3 细胞样本总 RNA 提取、反转录及实时定量 PCR 表达分析

相关实验方法参见第一部分 2.4-2.6

2.4 Western blot 蛋白印迹分析实验

相关实验方法参见第三部分 2.10

2.5 RNA Pull down 实验及质谱分析

为了研究与 circSCAP 互作的蛋白质，我们进行 RNA Pull-down 实验，具体实验步骤如下：

(1) 体外转录模板准备

我们委托济南博尚生物技术有限公司合成含 T7 启动子的引物。引物如下：

名称	引物	序列
CircSCAP-sence	Forward	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCTGCCGTGGTCA</u> CAGTG
	Reverse	TTTGCGGTCAGAGTCCACAG
CircSCAP-antisence	Forward	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTTGCGGTCAGAG</u> TCCACAG
	Reverse	GCTGCCGTGGTCACAGTG

以构建的 circSCAP 过表达质粒为模板，利用 T7 启动子序列融合引物，使用 Ambion MAXIscript SP6/T7 试剂盒通过 PCR 扩增得到转录产物。

(2) 生物素标记 RNA

1) 试剂准备：准备以下实验试剂：50 pmol 的 T7 转录后产物、氯仿-异戊醇混合液（24：1 比例配置）、50 mM NaCl、冰的 100%乙醇、冰的 70%乙醇、无核酸酶的移液枪枪头和 EP 管。将试剂盒的组分除 30% PEG 和 DMSO 外置于冰上融化，DMSO 置于室温，30% PEG 在 37°C 加热后融化备用。

2) 配置 8 μL RNA/DMSO 混合液，包括 2 μL DMSO 和 6 μL 上述 T7 转录后产物。将混合液在 85°C 加热 3min 后冰上冷却。

3) 随后准备以下体系至 EP 管，注意最后缓缓添加 30% PEG，并混匀体系。

名称	加入量
10×RNA Ligase Reaction Buffer	3 μL
RNase Inhibitor	1 μL
Non-labeled RNA Control or Test RNA	8 μL
Biotinylated Cytidine Bisphosphate	1 μL
T4 RNA Ligase	2 μL
30% PEG	15 μL

4) 设置 PCR 仪程序, 将 EP 管 16°C 过夜反应。向过夜后的 EP 管中加入 70 μL Nuclease-free Water, 然后加入 100 μL 氯仿-异戊醇混合液, 将混合物短暂震荡混匀后 4°C 高速离心 3 min 使液体分离。

5) 小心吸取上层分离的液体到新的 EP 管, 加入 10 μL 50 mM NaCl、1 μL Glycogen 和 300 μL 冰的 100%乙醇, 将 EP 管置于-80°C 冰箱过夜以沉淀 RNA。

6) 第二天, 将样本以 $\geq 13000g$ 的速度在 4°C 条件下离心 15 min 后, 吸弃上清液。并用 300 μL 预冷的 70%乙醇清洗沉淀, 吸弃乙醇后, 将沉淀晾干 5 min。

7) 重新加入 20 μL Nuclease-free Water 溶解沉淀。

(3) 蛋白样品制备

我们准备一个大皿的细胞, 每个大皿加入 400 μL 裂解液, 具体样品制备方法参见第三部分 2.10。

(4) RNA-蛋白的绑定

1) 磁珠使用前先进行预处理, 轻轻摇动使磁珠重悬混匀, 用剪去枪头尖的枪头吸取 80 μL 磁珠到新的 EP 管, 放在磁力架上将磁珠收集在一起。

2) 随后用 160 μL 的 0.1 M NaOH 清洗两次, 用 0.1 M NaCl 清洗一次, 继续用磁力架吸附收集磁珠。

3) 吸弃上清, 用 80 μL 的 20mM Tris (pH 7.5) 溶液清洗磁珠两次。

4) 吸弃上清, 加入 80 μL 1×RNA Capture Buffer 重悬磁珠。

5) 将 50 pmol 上述生物素标记的 RNA 小心加入到磁珠中, 轻柔操作确保均匀混合。随后, 使用垂直混悬仪进行 30 min 温和震荡混匀。重新将 EP 管放入磁力架中, 收集磁珠, 吸弃上清液。

6) 将磁珠用等体积 20mM Tris (pH7.5) 溶液清洗 2 次, 确保彻底清除残余的其他非特异性结合物。

7) 重新将 EP 管放入磁力架中, 收集磁珠, 吸弃上清液。加入 1×Protein-RNA Binding Buffer 到磁珠中并充分混匀。

8) 配制 RNA-蛋白的绑定体系

名称	加入量
----	-----

Lysate (protein conc.>2mg/mL)	60 μ L
50% glycerol	30 μ L
10 \times Protein-RNA Binding Buffer	10 μ L
Nuclease-free water	补齐至 100 μ L

9) 重新将 EP 管放入磁力架中, 收集磁珠, 吸弃上清液, 加入 100 μ L 配制的上述混合试剂。混合均匀并在 4 $^{\circ}$ C 冷库的垂直混悬仪中孵育 60 min。

(5) 洗涤和洗脱

1) 孵育结束后, 重新将 EP 管放入磁力架中, 收集磁珠, 吸弃上清液, 并加入 50 μ L 1 \times Wash Buffer 清洗两遍。

2) 清洗结束, 吸弃清洗液, 加入 50 μ L 的 Elution Buffer 到磁珠中并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

3) 将 EP 管放入磁力架中, 加入 1 \times SDS, 在 100 $^{\circ}$ C 金属浴上加热 10min 进行蛋白变性, 用于后续实验。

(6) 蛋白电泳

具体方法参见第三部分 2.10。

(7) 染色

电泳结束后, 小心从电泳槽中取出凝胶, 清洗干净后, 对凝胶进行染色以可视化蛋白质条带。根据实验要求选择考马斯亮蓝染色液或银染试剂盒进行操作。直至显示出清晰的目的条带。根据实验要求切割目的条带进行后续分析。

(8) 质谱分析

我们委托济南博尚生物技术有限公司对目的条带进行蛋白质谱分析。随后我们依据质谱数据, 进行特定肽段的识别和分析, 并采用图形化方法来直观展示分析结果。

2.6 过表达载体质粒的构建

2.6.1 启动子区表达载体的构建

(1) 查找启动子序列

启动子序列是指位于基因上游的调控区域, 能够与 RNA 聚合酶结合并起始转录过程的一段特异性 DNA 序列。我们通过 NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的基因数据库, 查找 SCD1 基因上游+2000bp~-100bp 位置的 DNA 序列, 即为 SCD1 的启动子区。

(2) 引物设计

通过 JASPAR 数据库网站我们预测到 SCD1 启动子区域中具有与 RXRA 互补的位点位于 SCD1 基因上游+993~-+1009 位置, 于是我们遵循常规引物设计的原则, 使用 SnapGene 软件设计 SCD1 启动子区引物如下表所示:

引物	序列
SCD1_promoter_F	GAAGATCTAGCTTGGGCTCTCATATGGTGTTC
SCD1_promoter_R	CCCAAGCTTTATCTCCTCCATTCTGCAGGACCCT

(3) PCR 扩增

为了大量扩增出 SCD1 启动子区片段,我们以 T47D 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增以产生相应的启动子片段,反应体系如下表:

试剂名称	体积
引物 1	2 μ L
引物 2	2 μ L
模板 cDNA	<800 ng
dNTP 混合物	8 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	20 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	2 μ L
RNase free water	补齐至 100 μ L

可以将退火温度从 55~70 $^{\circ}$ C, 设置 8 个温度梯度的反应体系进行退火温度的摸索:

温度	时间	循环数
94 $^{\circ}$ C	5 min	} 35 个循环
98 $^{\circ}$ C	10 s	
55~70 $^{\circ}$ C	5 s	
72 $^{\circ}$ C	1 kb/min	
72 $^{\circ}$ C	10 min	
4 $^{\circ}$ C	∞	

(4) 扩增片段确认

首先我们需要配制 1%的琼脂糖凝胶,并将其安装在电泳槽中。PCR 反应完成后,将样品取出,根据样本量加入相应体积的上样缓冲液并混匀。随后,将混合物平稳加入样品孔内,并在样品泳道两侧加上 DNA Ladder。接着,设定恒定电压为 120V,进行电泳分离。电泳完成后,取出凝胶,利用成像系统拍照记录条带分布。在某些情况下,为了优化 PCR 的退火温度,我们需要进行多轮实验,每轮使用不同的退火温度。根据最终观察到的目的带和非特异性带的状况,选择能产生最佳结果的退火温度,以便在后续实验中使用。

(5) 扩增片段纯化回收

我们切下琼脂糖凝胶中正确的凝胶条带,使用天根公司的 DNA 纯化回收试剂盒进行 DNA 分子的回收和纯化。

(6) 酶切反应

试剂名称	加入量
内切酶 1	1 μL
内切酶 2	1 μL
胶回收产物/质粒	2-5 μg
10 \times CutSmart Buffer	5 μL
RNase free water	补齐至 50 μL

设置 PCR 仪 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 将反应体系放入进行酶切反应。

(7) 连接反应

试剂名称	加入量
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	4 μL
T4 DNA 连接酶	2 μL
酶切载体 (纯化后)	10 μL
PCR 片段 (纯化后)	20 μL
RNase free water	补齐至 20 μL

(8) 转化

1) 转化所用的 E.coli DH5 α 感受态菌通常在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中长期保存, 实验操作时, 会被移出冰箱并在冰上缓慢化开;

2) 将 10 μL 的连接产物加入到 50 μL 的 DH5 α 菌液中, 轻轻混合后于冰上静置 20 min;

3) 金属启动浴并预热至 42 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 的孵育结束后, 迅速将 EP 管放在已预热好的金属浴中, 进行 1 min 30 s 的热激处理, 随后迅速转移到冰上进行冷却, 确保冷却时间在 2 min 以上。

4) 冷却完成后, 向每个 EP 管中加入 1 mL 不加抗生素的 LB 培养基, 并将 EP 管放在恒温摇床上, 设置 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 的条件, 震荡培养 1 h。

5) 培养结束后, 将 EP 管在常温下以 3000rpm 的转速离心 180 s。

6) 离心结束后, 保留大约 50 μL 的 LB 培养基以重悬细胞, 并均匀滴加在 LB 固体培养板内, 使用无菌刮刀将菌液均匀地涂抹在培养板表面。

7) 培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中正置 20 min, 随后翻转倒置并过夜培养。

8) 次日, 从取出平板并仔细观察菌落的大小以及数量, 用 10 μL 枪头挑取多个克隆菌落进行单独扩增培养。

(9) 菌液扩增

在无茵的 15 mL 离心管内加入 4 mL 的含相应抗生素的 LB 培养基, 并将挑取的单

个菌落转移至离心管中，于恒温摇床培养超过 2 h。

(10) 产物鉴定

将上述扩增后的单克隆菌落，每个取出 500 μL 菌液送至济南博尚生物技术有限公司进行测序。利用 SnapGene 软件对测序结果进行比对，以确定是否符合我们的预期。

(11) 质粒提取

经测序验证并符合预期的单克隆菌液，将被进一步扩增，按照天根公司无内毒素质粒提取试剂盒的指导步骤进行提取。

2.6.2 定点突变表达载体的构建

我们在本研究中采用高保真的 KOD-Plus-酶，通过反向 PCR 法进行定点突变。

(1) PCR 引物设计：我们遵循常规引物设计的原则，使用 SnapGene 软件把突变设计入引物，引物序列如下：

引物	序列
KOD-F	TGGGAGGTGGGTACCC
KOD-R	ACAGAAAACGATTCTTGTGAATTGG

(2) 反向 PCR

1) 实验准备：提前准备好 LB 琼脂培养基、50 mg/ml 氨苄青霉素、DH5 α 感受态细胞、10 pmol/ μL 的引物、50 ng/ μL 模板质粒 DNA。

2) 反应体系准备：按照以下配比配制 PCR 反应液。

组分	用量
引物 1 (10 pmol/ μL)	1.5 μL
引物 2 (10 pmol/ μL)	1.5 μL
10 \times Buffer	5 μL
灭菌蒸馏水	35 μL
dNTPs (2 mM)	5 μL
Plasmid DNA (50 ng/ μL)	1 μL
KOD-Plus-酶	1 μL
总体积	50 μL

3) 按以下条件进行 PCR 反应，并设置循环数为 5 个。

组分	用量
94 $^{\circ}\text{C}$	2 min
98 $^{\circ}\text{C}$	10 s
68 $^{\circ}\text{C}$	5 min
4 $^{\circ}\text{C}$	∞

(3) 用 DpnI 对模板质粒 DNA 进行消化

向 PCR 仪中的 PCR 反应液加入 2 μL Dpn I 进行消化反应，轻轻混匀后瞬离，放回 PCR 仪，重新设置 37°C 反应 1 小时。

(4) PCR 产物自身环化

将 T4 Polynucleotide Kinase 和 Ligation high 在冰上融解。按下表所示配制反应液，放入 PCR 仪，设置 16°C 反应 1 小时。

组分	用量
T4 Polynucleotide Kinase	1 μL
Dpn I 处理后 PCR 产物	2 μL
Ligation high	5 μL
灭菌蒸馏水	7 μL
总体积	15 μL

(5) 转化

将环化的 PCR 产物加入激活的 DH5 α 大肠杆菌感受态进行转化，具体操作与普通转化相同。

(6) 突变体确认

用 10 μL 小枪头的尖端挑取 5 个菌落打进 LB 培养基中，进行五个菌落的扩增，将扩增后的菌液每个样本随机吸取 1 mL 送到擎科测序公司进行插入片段的测序，将测序结果与原启动子序列进行比对，确认是否产生突变。

2.7 双荧光素酶报告基因

1) 载体构建：我们使用带有萤火虫荧光素酶基因的 PGL4.26 载体为模板，按照上述构建方法构建 SCD1 启动子区野生型载体和 PGL4.26-PROMOTER-WT，和 SCD1 启动子区定点突变型载体 PGL4.26-PROMOTER-MUT。

2) 细胞准备：将 HEK-293T 细胞接种于 48 孔板中，以使转染时密度为 70% 左右。周围空白孔用 400 μL PBS 封边。

3) 细胞转染：具体的操作方法参考上文转染方法，将贴壁后生长良好 HEK-293T 细胞分为以下几组进行转染：

组别	转染内容
pRL-CMV PGL4.26	空白对照
	PLCDH+siNC
	CircSCAP+siNC
PGL4.26- PROMOTER-WT	CircSCAP+siRXRA
	PLCDH+siNC
	CircSCAP+siNC
PGL4.26-PROMOTER-MUT	CircSCAP+siRXRA

4) 检测试剂的准备: 将试剂盒的各组分从-20°C冰箱拿出后, 室温融解萤火虫荧光素酶检测试剂和海肾荧光素酶检测缓冲液。随后, 按照 1:100 的稀释比例, 在缓冲液中稀释海肾荧光素酶检测底物, 供后续实验使用。

5) 细胞裂解: 彻底吸除培养板中的培养基, 向每个孔加入 150 μL 的萤火虫荧光素酶报告基因细胞裂解液, 轻轻吹打细胞, 进行充分裂解后, 以 12,000g 转速离心 5 min, 小心地收集上清液, 用于后续的荧光素酶活性测定。

6) 双荧光素酶检测: 用移液枪枪取 20 μL 上清, 与 100 μL 萤火虫荧光素酶检测试剂在室温下进行充分混匀, 加入到 96 孔板室温下孵育 5 min, 使发光信号趋于稳定。5 min 后迅速放入多功能酶标仪进行发光检测萤火虫荧光素酶 RLU1。检测完成后, 立即加入 100 μL 预先平衡至室温的海肾荧光素酶检测工作液, 以终止反应, 适当混匀, 室温孵育 5 min, 放入多功能酶标仪进行发光检测海肾荧光素酶 RLU2。

7) 数据分析: 以萤火虫荧光素酶为内参, 比较测定萤火虫荧光素酶得到的 RLU1 与测定海肾荧光素酶得到的 RLU2 的比值, 显示不同组间 SCD1 启动子区域的激活程度。

2.8 数据统计与分析

本部分研究的数据分析参见第二部分。

研究结果

1.SCD1 是 circSCAP 作用于脂肪酸代谢重编程的功能靶点

SCD1 是一种位于内质网的脂肪酸去饱和酶。它从调节饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比例入手影响脂肪酸代谢的平衡, 包括控制脂肪酸的合成和积累以及脂肪酸的氧化分解。许多研究表明 SCD1 在维持肿瘤细胞干细胞特性及乳腺癌恶性进展方面起着重要作用。为了确定 SCD1 是否是 circSCAP 的下游功能靶点, 我们选取四种激素受体阳性乳腺癌细胞进行了实验。在干扰 circSCAP 后, 我们通过 RT-qPCR 实验检测了 SCD1 在 mRNA 水平上的表达变化, 随着 circSCAP 表达降低 SCD1 的 RNA 转录水平降低 (图 19A-D)。通过 Western blot 蛋白印迹分析, 我们同样观察到 SCD1 与 circSCAP 的蛋白表达水平呈正相关 (图 19E-H)。于是, 我们猜测 circSCAP 调控下游关键酶 SCD1 表达, SCD1 是 circSCAP 作用于脂肪酸代谢重编程的功能靶点。

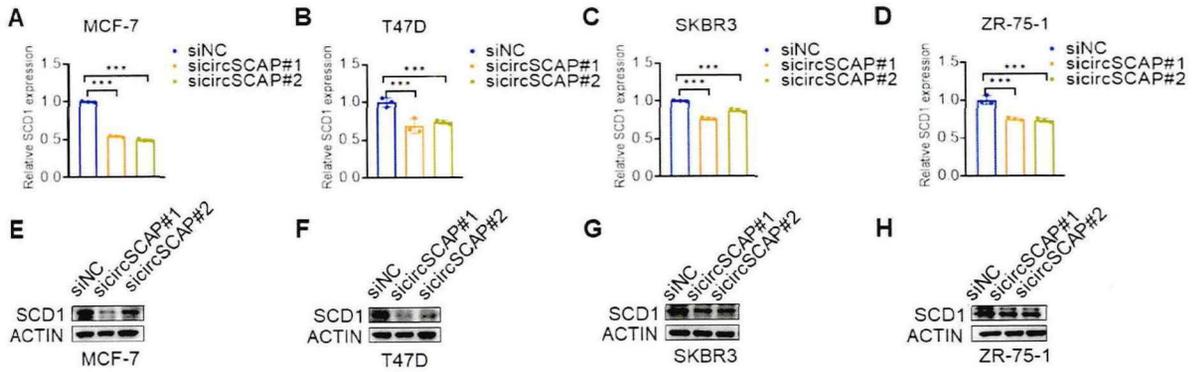


图 19 SCD1 是 circSCAP 作用于脂肪酸代谢重编程的功能靶点

Fig. 19 SCD1 was the functional target of circSCAP for fatty acid metabolic reprogramming

(A-D) 在四种激素受体阳性乳腺癌细胞系中, RT-qPCR 分析敲低 circSCAP 后 SCD1 mRNA 水平的表达变化。(E-F)在四种激素受体阳性乳腺癌细胞系中, Western blot 分析敲低 circSCAP 后 SCD1 蛋白水平的表达变化。

2.CircSCAP 通过调控转录因子 RXRA 调节 SCD1 表达

为了探索 circSCAP 调节 SCD1 表达的具体分子机制, 我们进行了 RNA Pull down 实验来探寻他们之间的联系, 是直接结合还是通过第三方的桥梁分子。我们将生物素标记的 circSCAP 正义链和反义链探针下拉的潜在结合蛋白进行质谱分析 (Mass spectrometry, MS) (图 20A), 并通过 Human TFDB 和 PROMO 网站预测结合到 SCD1 启动子区域的转录因子。维恩图显示了质谱数据集和结合到 SCD1 启动子区域的转录因子的交集 (图 20B), 我们发现了 RXRA (Retinoid X receptor alpha, RXRA) 分子。RXRA 是一种核受体家族成员, 作为转录因子, 可以结合到 DNA 上, 调控基因的转录和表达。为了验证 circSCAP 是否通过 RXRA 调节 SCD1 表达, 我们使用公共网站 JASPAR (<https://jaspar.elixir.no/>) 预测 SCD1 启动子区域与转录因子 RXRA 的结合位点和结合模式 (图 20E), 然后我们构建了插入野生型 (WT) 和突变型 (MUT) SCD1 启动子区的荧光素酶报告基因载体。双荧光素酶报告基因检测表明, circSCAP 可以通过调节转录因子 RXRA 来转录激活 SCD1 (图 20C)。Western blot 分析进一步验证了 circSCAP 可以调节 RXRA 的表达 (图 20D)。综上所述, circSCAP 通过调控转录因子 RXRA 调节 SCD1 表达水平。

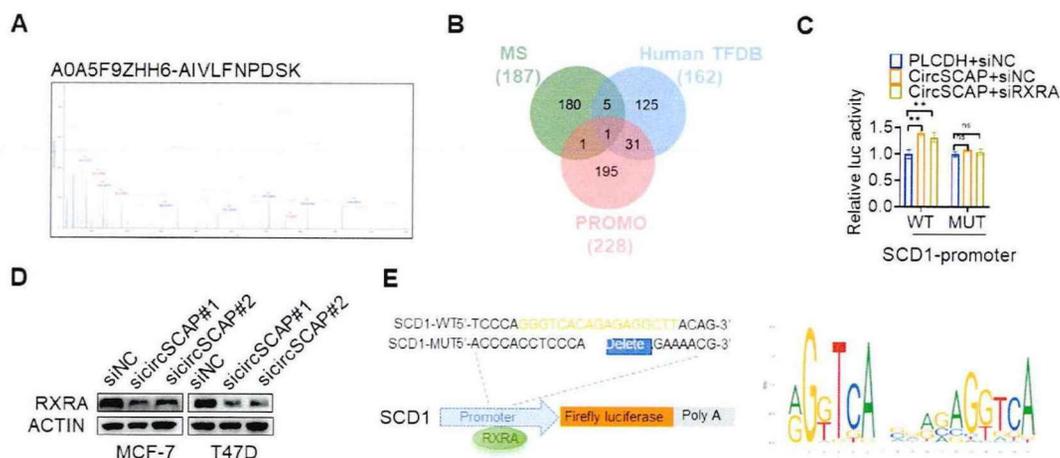


图 20 CircSCAP 通过调控 RXRA 调节 SCD1 表达

Fig. 20 CircSCAP regulated SCD1 expression by regulating RXRA

(A) 质谱图显示 circSCAP 下拉的蛋白肽段。(B) 维恩图显示了质谱分析、Human TFDB 数据库和 PROMO 数据库的 SCD1 启动子数据集的交集。(C) 转染 SCD1 promoter-WT 组和 SCD1 promoter -MUT 组的小干扰和质粒后, 在 HEK-293T 细胞中进行双荧光素酶报告基因实验。(D) Western blot 分析敲低 circSCAP 后在 MCF-7 和 T47D 细胞中 RXRA 和 SCD1 的表达变化。(E) 左图是对 SCD1 启动子区定点突变示意图, 右图是 JASPAR 数据库预测 RXRA 和 SCD1 结合位点。

3.CircSCAP 通过调控 SCD1 调控脂肪酸代谢重编程

由以上实验结果, 我们猜测 circSCAP 通过调控 SCD1 调控脂肪酸代谢重编程。随后, 我们进行了一些 Rescue 实验, 以探讨 circSCAP 的具体作用机制。首先, 我们将 circSCAP 过表达质粒和 SCD1 的小干扰 RNA 同时转染到 MCF-7 和 T47D 细胞中。油红 O 染色(图 21A)和 Bodipy 493/503 染色(图 21B)结果表明, 干扰 SCD1 可以降低 circSCAP 过表达对脂肪酸脂滴累积的影响。Western blot 检测同样证明了 circSCAP 过表达后 SCD1 沉默对脂肪酸合成途径的抑制作用(图 21C)。而线粒体氧化速率检测结果显示干扰 SCD1 可以挽救 circSCAP 过表达对脂肪酸氧化降低的影响(图 21D)。

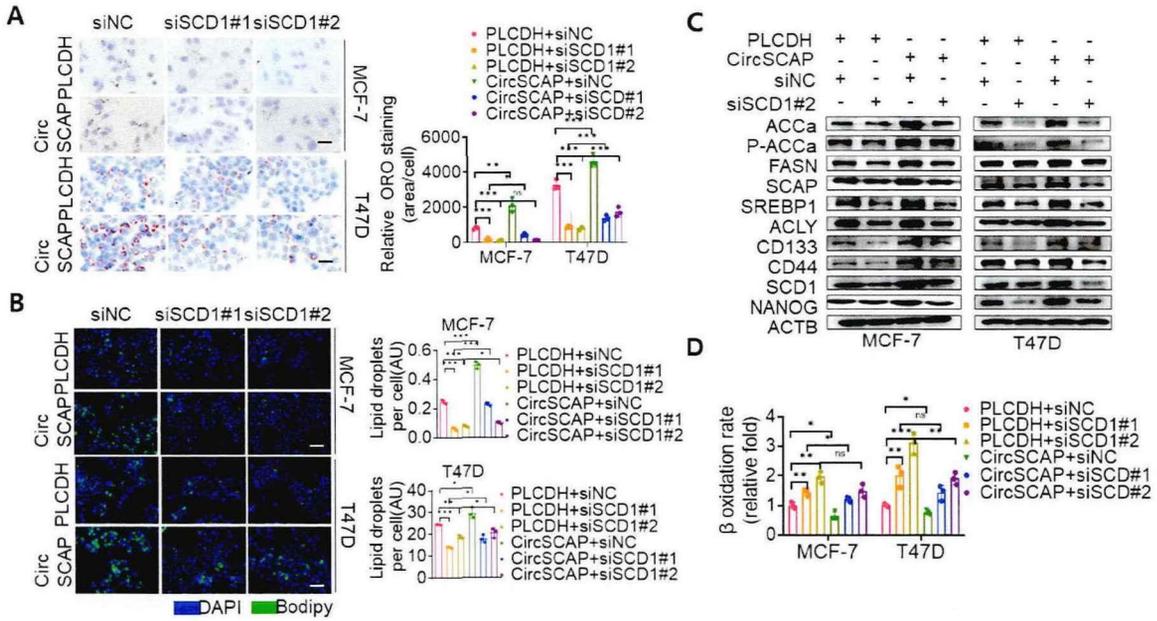


图 21 CircSCAP 通过调控 SCD1 调控脂肪酸代谢重编程

Fig. 21 CircSCAP regulated fatty acid metabolic reprogramming by regulating SCD1

(A-C) MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、siSCD1#1、siSCD1#2 和质粒 PLCDH、circSCAP，通过油红 O (A) 和 Bodipy 493/503 (B) 染色分析脂滴聚集能力，并通过 Western blot 分析 (C) 检测脂肪酸合成途径蛋白水平。比例尺，50 μ m。(D) MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、siSCD1#1、siSCD1#2 和质粒 PLCDH、circSCAP 后线粒体脂肪酸氧化速率的变化。

然后我们沉默 circSCAP 的同时在 MCF-7 和 T47D 细胞中过表达 SCD1。油红 O 染色 (图 22A) 和 Bodipy 493/503 染色 (图 22B) 结果表明，沉默 circSCAP 大大减少了脂滴积累，而过表达 SCD1 可以部分抵消干扰 circSCAP 对激素受体脂肪酸代谢活性的抑制作用。通过 Western blot 检测，脂肪酸代谢合成途径中的酶的变化与上述表型一致 (图 22C)。相反，线粒体氧化速率检测结果显示干扰 circSCAP 可以提高 circSCAP 过表达对脂肪酸氧化降低的影响 (图 22D)。综上所述，这些结果表明 circSCAP 通过调节激素受体阳性乳腺癌中 SCD1 的表达来促进脂肪酸代谢。

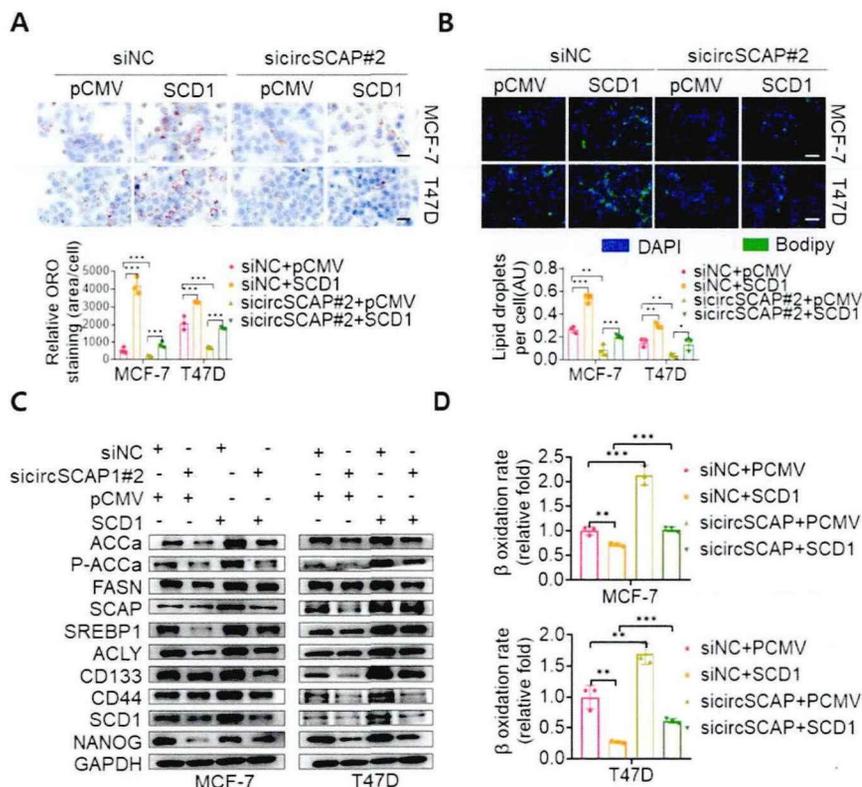


图 22 CircSCAP 调控下游 SCD1 介导的脂肪酸代谢重编程

Fig. 22 CircSCAP regulated downstream SCD1-mediated fatty acid metabolic reprogramming

(A-C) MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、sicircSCAP#2 和质粒 pCMV、SCD1，通过油红 O (A) 和 Bodipy 493/503 (B) 染色分析脂滴聚集能力，并通过 Western blot 分析 (C) 检测脂肪酸合成途径蛋白水平。比例尺，50 μm 。(D)MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、sicircSCAP#2 和质粒 pCMV、SCD1 后线粒体脂肪酸氧化速率的变化。

4.CircSCAP 通过调控 SCD1 调控激素受体阳性乳腺癌增殖侵袭等恶性特征

为了进一步研究 circSCAP 通过 SCD1 介导的脂肪酸代谢途径在激素受体阳性乳腺癌中的功能,我们设计了细胞增殖和转移的 Rescue 实验。一方面,我们在 MCF-7 和 T47D 细胞中共转染 circSCAP 过表达质粒和 SCD1 的小干扰。如图所示,在 MTT (图 23A) 和克隆形成实验 (图 23B) 中,癌细胞的生长和增殖能力被沉默的 SCD1 部分阻断。EdU 实验 (图 23C) 和细胞周期相关蛋白的 Western blot 分析 (图 23D) 表明,沉默 SCD1 可以消除 circSCAP 过表达对癌细胞增殖的促进作用。同时,划痕试验中划痕内转移性和侵袭性癌细胞的数量也因 SCD1 表达的降低而减少 (图 23E-F)。

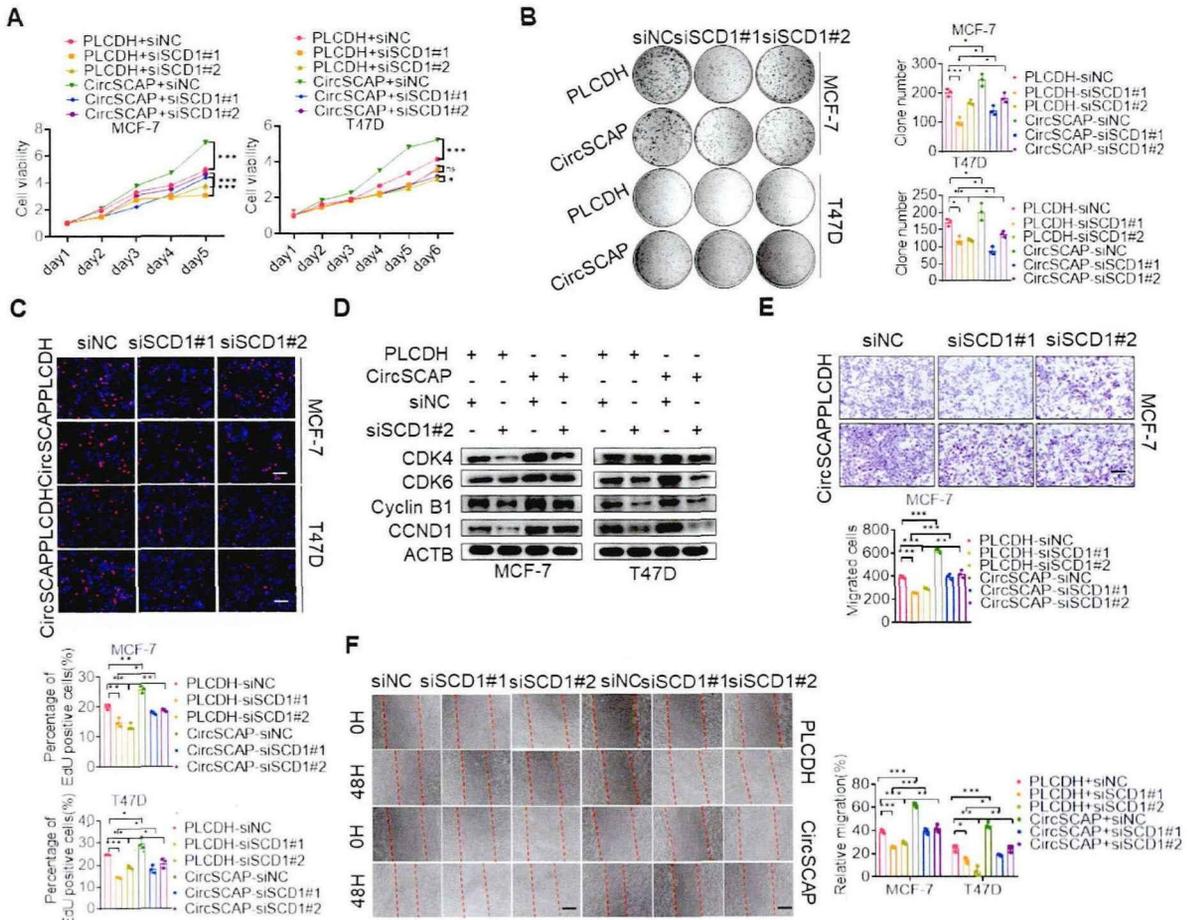


图 23 CircSCAP 调控 SCD1 对激素受体阳性乳腺癌恶性进展的影响

Fig. 23 Effect of circSCAP on the malignant progression of HR+ breast cancer by regulating SCD1

(A-C) MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、siSCD1#1、siSCD1#2 和质粒 PLCDH、circSCAP, MTT (A), 克隆形成 (B) 和 EdU 分析 (C) 沉默 SCD1 对增殖能力的 Rescue 效果。比例尺, 100 μ m。(D) Western blot 分析沉默 SCD1 对 MCF-7 和 T47D 细胞中细胞周期相关蛋白的 Rescue 作用。(E-F) Transwell 实验 (E) 和划痕实验 (F) 分析沉默 SCD1 对 MCF-7 和 T47D 细胞迁移能力的 Rescue 作用。比例尺, 200 μ m。

另一方面, 在 MCF-7 和 T47D 细胞中, 同时转染 SCD1 的过表达质粒和靶向 circSCAP 的 siRNA。正如预期的那样, MTT (图 24A) 和克隆形成实验 (图 24B) 结果表明, 与对照组相比, SCD1 水平增加可以部分消除沉默 circSCAP 对增殖能力的影响。EdU (图 24C) 和 Western blot 检测 (图 24D) 结果证明, 过表达 SCD1 会消除由于沉默 circSCAP 而对癌细胞增殖能力的负面影响。此外, 伤口愈合实验 (图 24E) 表明, SCD1 过表达可以逆转 circSCAP 敲低对 MCF-7 和 T47D 细胞迁移和侵袭的影响。总之, circSCAP 通过靶向脂肪酸代谢途径中的 SCD1 来控制激素受体阳性乳腺癌的进展。

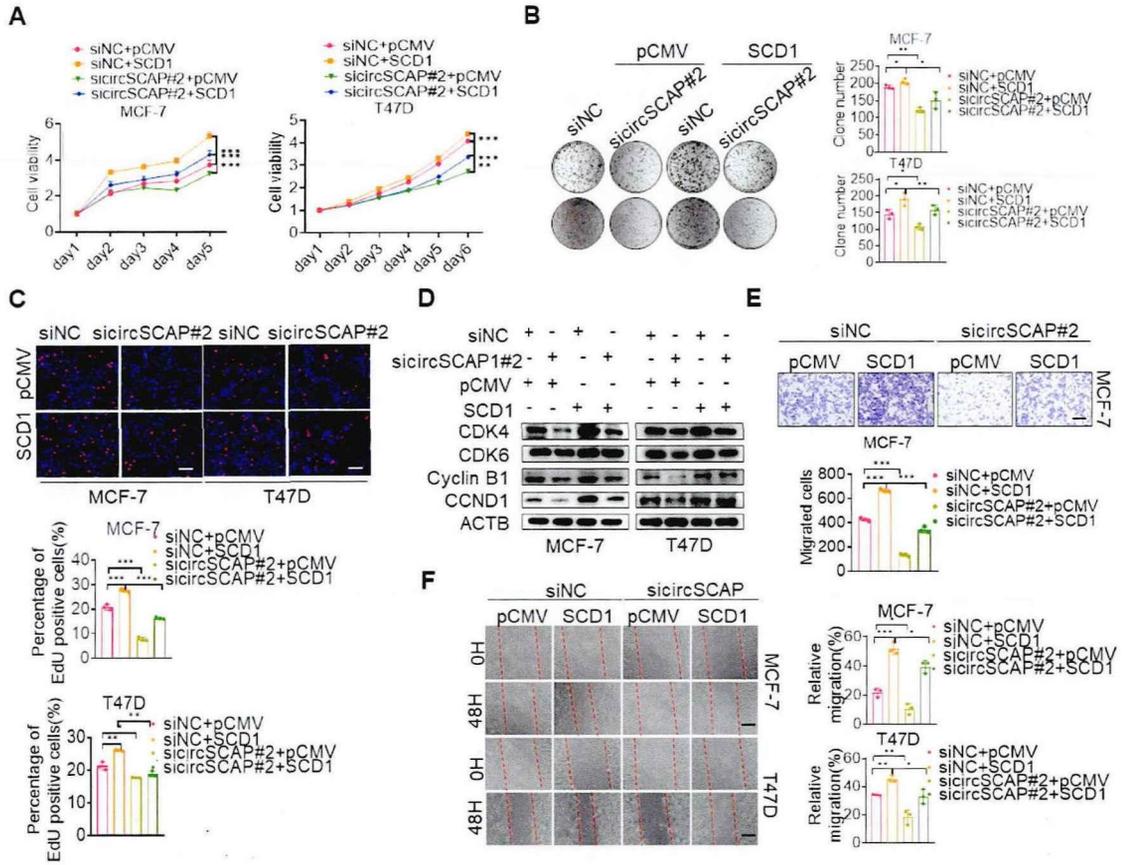


图 24 CircSCAP 调控 SCD1 对激素受体阳性乳腺癌恶性进展的影响

Fig. 24 Effect of circSCAP on the malignant progression of HR+ breast cancer by regulating SCD1

(A-C) MCF-7 和 T47D 细胞同时转染小干扰 siNC、siCircSCAP#2 和质粒 pCMV、SCD1，MTT (A)，克隆形成 (B) 和 EdU 分析 (C) 过表达 SCD1 对增殖能力的 Rescue 效果。比例尺，100 μ m。
 (D) Western blot 分析过表达 SCD1 对 MCF-7 和 T47D 细胞中细胞周期相关蛋白的 Rescue 作用。
 (E-F) Transwell 实验 (E) 和划痕实验 (F) 分析过表达 SCD1 对 MCF-7 和 T47D 细胞迁移能力的 Rescue 作用。比例尺，200 μ m。

5. CircSCAP 通过调节 SCD1 介导的脂肪酸代谢重编程促进激素受体阳性乳腺癌进展转移的机制

以上实验结果表明，在激素受体阳性乳腺癌中，由 SCAP 基因反向剪接形成的 circSCAP 促进了转录因子 RXRA 的表达。CircSCAP 与 RXRA 结合后激活并增加了下游 SCD1 的转录，进而促进脂肪酸代谢重编程中的脂肪酸合成及脂滴积累，抑制脂肪酸的 β -氧化速率。这一过程增加了癌细胞的干性特征进而促进激素受体阳性乳腺癌进展转移。

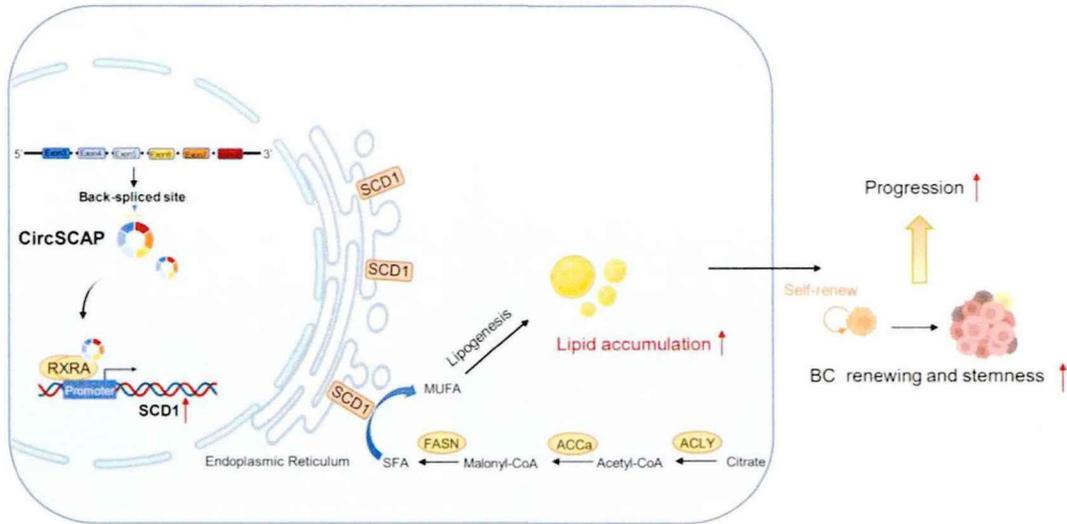


图 25 CircSCAP 通过调节 SCD1 介导的脂肪酸代谢重编程促进激素受体阳性乳腺癌进展转移的机制

Fig. 25 The mechanism of circSCAP which promotes fatty acid metabolism reprogramming and affects the malignant progression of hormone receptor-positive breast cancer

讨 论

激素受体阳性乳腺癌是女性最常见的乳腺癌亚型^[40]。尽管内分泌治疗、化疗、靶向治疗等多种治疗方法已应用于临床，但远期复发率增加和预后优势下降仍然是临床医生面临的主要困境之一^[41, 42]。自 45 年前被发现以来，circRNA 的遗传多样性、表达丰富性、进化保守性和功能多样性在癌症领域中引起了极大的关注^[43]。由此，越来越多的证据表明，异常的 circRNA 参与脂肪酸代谢重编程或癌症干性进展，以调节各种癌症的增殖和转移，已成为癌症治疗的标志之一。例如，circCAPRIN1 结合信号转导子和转录激活子 2 (STAT2) 来激活 ACC1 的转录，进而调节脂质代谢并促进结直肠癌的发生^[44]，而另一个 circFAM73A 通过与 miR-490-3p/HMGA2 形成正反馈环来促进癌症干细胞特性，证明了其在胃癌中作为预后预测因子和潜在治疗靶点的内在价值^[45]。因此，探索 circRNA 失调的分子机制有期望为激素受体阳性乳腺癌的精准治疗提供了新的思路和方向。

在本研究中，我们在激素受体阳性乳腺癌中鉴定出一种新型 circRNA (circSCAP, circBase ID: hsa_circ_0065214)，它由 SCAP 基因的六个外显子反向剪接产生。我们的研究结果证明，相对于其他分子亚型，circSCAP 在激素受体阳性乳腺癌组织中表达上调最显著，同样，在激素受体阳性乳腺癌细胞系中表达上调最明显，提示 circSCAP 的异常表达可能在激素受体阳性的乳腺癌发展中充当关键的致癌因子。进一步的生存分析验证了，circSCAP 作为一种潜在的癌基因，是激素受体阳性乳腺癌的独立危险因素，与总生存期和无病生存期关联。随后我们验证了 circSCAP 具有稳定的共价闭环状结构且主要在细胞核中发挥潜在作用。为了确定 circSCAP 的功能作用，我们实行一系列肿瘤表型试验，发现沉默 circSCAP 会抑制增殖、迁移功能表型和干性特征。相反，circSCAP 过表达质粒可以促进上述恶性进展，这表明 circSCAP 在激素受体乳腺癌中充当促癌分子的能力。

脂肪酸代谢重编程是癌症的代谢标志，包括脂肪酸摄取、合成、储存和利用的异常。脂肪酸代谢在肿瘤组织不同于正常组织中的重要性，使其成为有吸引力的研究方向和治疗靶向^[46]。多项研究表明 circRNA 与脂滴的积累密切相关并影响乳腺癌细胞的增殖和转移特性^[47]。CircSCAP 来源的亲本 SCAP 基因是脂肪酸从头合成途径中的重要分子，与脂肪酸代谢异常密切相关^[48, 49]。我们想知道 circSCAP 是否也可以通过影响脂肪酸的产生、累积及氧化分解途径来重新编程脂肪酸代谢，从而影响激素受体阳性乳腺细胞的恶性进展。本研究利用经典的油红 O 染色和 Bodipy 493/503 荧光探针染色，结果表明，circSCAP 可以增加细胞质中红色的脂质积累范围。另一方面，我们从蛋白质分子的角度

利用 Western blot 分析分析了 circSCAP 对脂质合成途径的影响, 结果表明 circSCAP 增加了脂肪酸从头合成代谢的整体表达。此外, circSCAP 降低了脂肪酸 β -氧化分解的速率。总之, 上述证据表明, circSCAP 通过增加脂肪酸合成及积累和减少氧化分解来调节激素受体阳性乳腺癌的脂肪酸代谢。

脂肪酸代谢的重编程与肿瘤干细胞的调控密切相关^[50]。多项研究表明脂肪酸代谢调控可以维持癌细胞的干细胞特性^[51, 52]。例如, 在结直肠 CSC 中, 高水平的 LDs 是 CSCs 的独特性标志物, LDs 的水平也随着其他公认的成熟的 CSC 标志物如 CD133、激活的 Wnt 通路等而波动^[53]。然而, 脂肪酸代谢相关 RNA 分子是否及如何在癌症干细胞的形成中发挥作用仍然是一个谜, 例如负责编码的 mRNA, 甚至非编码的 circRNA、microRNA 等^[54]。为了探索激素受体阳性乳腺癌中 circSCAP 如何调控癌细胞的干性特征, 我们使用了脂肪酸合成抑制剂 C75。C75 是一种更稳定的浅蓝菌素合成模拟物, 可以抑制脂肪酸的从头合成^[55]。首先, 我们验证了 C75 的作用, 根据结果部分, 油红 O 染色和 Bodipy 493/503 染色显示, 尽管 circSCAP 在 MCF-7 和 T47D 细胞中上调脂肪酸合成途径, 但 C75 对此有显著的抑制作用。同时, 我们观察到脂肪酸合成的减少抑制了癌症干细胞的形成以及干细胞标记蛋白的表达水平。类器官是在体外模拟器官三维结构和生理功能的 3D 模型, 我们培养了激素受体阳性乳腺癌的类器官模型, 结果发现 C75 对癌症干细胞形成的负面影响。由上可见, 在激素受体阳性乳腺癌中, 抑制脂肪酸代谢与削弱癌症干性具有串联作用。

为了进一步了解 circSCAP 通过脂肪酸代谢重编程影响癌症进展转移的具体分子机制, 我们发现了一个在脂肪酸合成中的关键限速酶 SCD1。SCD1 是一种具有四层跨膜结构域的去饱和酶, 横跨内质网膜, 负责将饱和脂肪酸转化为单不饱和脂肪酸^[56]。SCD1 作为脂肪酸从头合成和储存途径的关键分子, 调节饱和和不饱和脂肪酸平衡的同时, 影响脂肪酸氧化分解代谢。许多研究表明, SCD1 促进癌细胞的进展^[57], 并维持干细胞样特征^[58, 59]。因此, 我们推测 circSCAP 通过 SCD1 调节激素受体阳性乳腺癌的脂肪酸代谢重编程过程。我们首先在四种激素受体阳性乳腺癌细胞系中检测了干扰 circSCAP 后 SCD1 在 RNA 和蛋白质水平的表达变化, 结果证明 circSCAP 可以影响 SCD1 转录和翻译。为了探究 circSCAP 影响 SCD1 表达的具体分子机制, 我们进行了 RNA pull-down 和质谱分析。将得到的数据集与 SCD1 的启动子区域相交, 得到转录因子 RXRA。我们进一步进行了双荧光素酶报告基因实验, 验证了 circSCAP 通过转录因子 RXRA 对 SCD1 启动子区域的激活作用。因此, 我们提出 circSCAP 通过 RXRA 调节 SCD1 的表达, 调控脂肪酸代谢重编程从而影响激素受体阳性乳腺癌的恶性进程。为了进一步验证, 我们设计了一系列功能分析的挽救实验, 证明了 SCD1 是 circSCAP 的下游靶标, 并且 circSCAP 确实通过调节 SCD1 在癌症干性和恶性进展中发挥作用。综合以上结果, 我们证实了 circSCAP 通过调控 SCD1 介导的脂肪代谢重编程来影响激素受体阳性乳腺

癌的具体分子机制。

综上所述，我们的研究证明了 circSCAP 对激素受体阳性乳腺癌脂肪酸代谢重编程和癌症干性特征的调节特征。从机制上来说，我们推测 circSCAP 与转录因子 RXRA 结合增加了脂肪酸合成途径中关键酶 SCD1 的表达。SCD1 的上调扩大了脂肪酸合成和积累以及减少脂肪酸的氧化分解，增强了癌症干细胞特征，进而促进了激素受体阳性乳腺癌的进展和转移。至关重要的是，我们的研究表明，circSCAP 可能为激素受体阳性乳腺癌潜在的诊断及预后标志物，尤其是在脂肪酸代谢活跃的患者中，为其提供新的治疗指导。

结 论

本研究报道了新型环状 RNA 分子 circSCAP 调控激素受体阳性乳腺癌进展转移的功能和分子机制研究。本文的主要结论如下：

1. CircSCAP 在激素受体阳性乳腺癌组织及细胞系中显著高表达，并且 circSCAP 的表达水平与激素受体阳性乳腺癌患者的不良临床结局及预后密切相关。
2. CircSCAP 具有稳定的闭合环状特性，且主要在细胞核中发挥作用。
3. CircSCAP 促进激素受体阳性乳腺癌增殖转移等恶性进展，发挥促癌基因的作用。
4. CircSCAP 通过促进脂肪酸代谢的从头合成、存储及抑制氧化分解途径，影响激素受体阳性乳腺癌干性特征及恶性进展。
5. CircSCAP 通过转录因子 RXRA 上调 SCD1 的表达，进而调控 SCD1 介导的脂肪代谢重编程来影响激素受体阳性乳腺癌进展及转移的功能。

参考文献

- [1] Giaquinto A N, Sung H, Miller K D, et al. Breast Cancer Statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(6): 524-41.
- [2] Qi J, Li M, Wang L, et al. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005-20: an analysis of national mortality surveillance data [J]. *Lancet Public Health*, 2023, 8(12): e943-e55.
- [3] Perou C M, Sørlie T, Eisen M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-52.
- [4] Tarantino P, Hamilton E, Tolaney S M, et al. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(17): 1951-62.
- [5] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 66.
- [6] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134-50.
- [7] Cuzick J. Aromatase inhibitors for breast cancer prevention [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(8): 1636-43.
- [8] Jordan V C. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(1): 46-53.
- [9] Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials [J]. *Lancet*, 2005, 365(9472): 1687-717.
- [10] Musgrove E A, Sutherland R L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(9): 631-43.
- [11] Xiao Y, Yu T-J, Xu Y, et al. Emerging therapies in cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(8): 1283-303.
- [12] Ward P S, Thompson C B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 297-308.
- [13] Yoshida G J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 111.
- [14] Pavlova N N, Thompson C B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47.
- [15] Zhou X, Zhang J, Lv W, et al. The pleiotropic roles of adipocyte secretome in remodeling

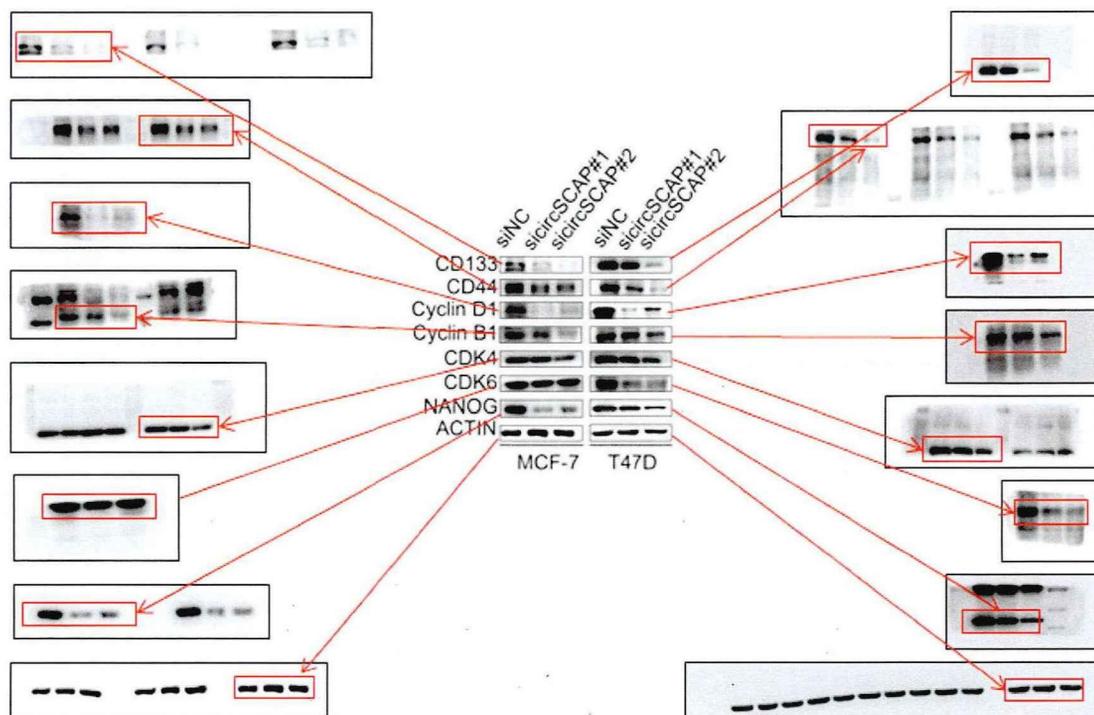
- breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 203.
- [16]Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 732-49.
- [17]Zaidi N, Swinnen J V, Smans K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(15): 3709-14.
- [18]Szutowicz A, Kwiatkowski J, Angielski S. Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and nonmalignant diseases of the human breast [J]. *Br J Cancer*, 1979, 39(6): 681-7.
- [19]Milgraum L Z, Witters L A, Pasternack G R, et al. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(11): 2115-20.
- [20]Xuan Y, Wang H, Yung M M, et al. SCD1/FADS2 fatty acid desaturases equipose lipid metabolic activity and redox-driven ferroptosis in ascites-derived ovarian cancer cells [J]. *Theranostics*, 2022, 12(7): 3534-52.
- [21]Lingrand M, Lalonde S, Jutras-Carignan A, et al. SCD1 activity promotes cell migration via a PLD-mTOR pathway in the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line [J]. *Breast Cancer*; 2020, 27(4): 594-606.
- [22]Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36 [J]. *Nature*, 2017, 541(7635): 41-5.
- [23]Chen Y, Rui B-B, Tang L-Y, et al. Lipin family proteins--key regulators in lipid metabolism [J]. *Ann Nutr Metab*, 2015, 66(1): 10-8.
- [24]Ahn S, Park J H, Grimm S L, et al. Metabolomic Rewiring Promotes Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(2): 291-304.
- [25]Zaugg K, Yao Y, Reilly P T, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1041-51.
- [26]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): 675-91.
- [27]Hsu M T, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells [J]. *Nature*, 1979, 280(5720): 339-40.
- [28]Kristensen L S, Jakobsen T, Hager H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 188-206.
- [29]Liu C-X, Chen L-L. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications [J]. *Cell*, 2022, 185(12): 2016-34.

- [30] Li X, Yang L, Chen L-L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428-42.
- [31] Chen L-L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-90.
- [32] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-8.
- [33] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-8.
- [34] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-64.
- [35] Huang D, Zhu X, Ye S, et al. Tumour circular RNAs elicit anti-tumour immunity by encoding cryptic peptides [J]. *Nature*, 2024, 625(7995): 593-602.
- [36] Yu X, Tong H, Chen J, et al. CircRNA MBOAT2 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression and lipid metabolism reprogramming by stabilizing PTBP1 to facilitate FASN mRNA cytoplasmic export [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 20.
- [37] 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(9): 1638-52.
- [38] Chen H, Yang R, Xing L, et al. Hypoxia-inducible CircPFKFB4 Promotes Breast Cancer Progression by Facilitating the CRL4DDB2 E3 Ubiquitin Ligase-mediated p27 Degradation [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(9): 3888-907.
- [39] Yang F, Fang E, Mei H, et al. Cis-Acting circ-CTNNB1 Promotes β -Catenin Signaling and Cancer Progression via DDX3-Mediated Transactivation of YY1 [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(3): 557-71.
- [40] Nunnery S E, Mayer I A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer [J]. *Drugs*, 2020, 80(16): 1685-97.
- [41] Wilcock P, Webster R M. The breast cancer drug market [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(5): 339-40.
- [42] Burstein H J. Systemic Therapy for Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(26): 2557-70.
- [43] Yu T, Wang Y, Fan Y, et al. CircRNAs in cancer metabolism: a review [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 90.
- [44] Yang Y, Luo D, Shao Y, et al. circCAPRN1 interacts with STAT2 to promote tumor progression and lipid synthesis via upregulating ACC1 expression in colorectal cancer [J].

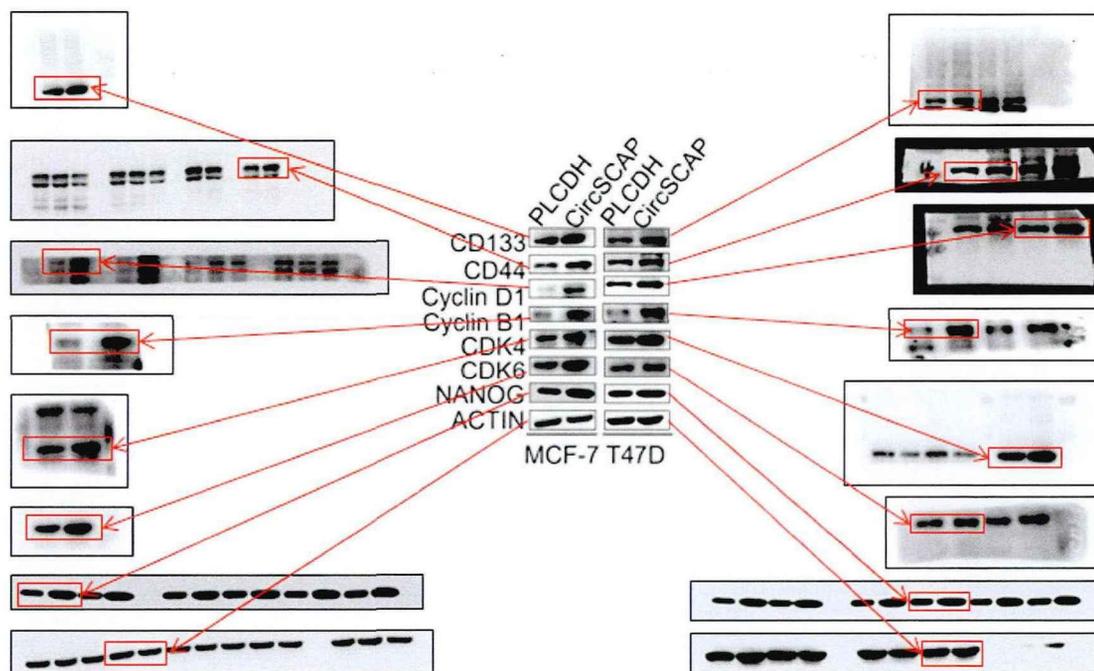
- Cancer Commun (Lond), 2023, 43(1): 100-22.
- [45] Xia Y, Lv J, Jiang T, et al. CircFAM73A promotes the cancer stem cell-like properties of gastric cancer through the miR-490-3p/HMGA2 positive feedback loop and HNRNPK-mediated β -catenin stabilization [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 103.
- [46] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer [J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153-61.
- [47] Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer D E, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth [J]. Cancer Cell, 2005, 8(4): 311-21.
- [48] Cheng C, Geng F, Li Z, et al. Ammonia stimulates SCAP/Insig dissociation and SREBP-1 activation to promote lipogenesis and tumour growth [J]. Nat Metab, 2022, 4(5): 575-88.
- [49] Cheng X, Li J, Guo D. SCAP/SREBPs are Central Players in Lipid Metabolism and Novel Metabolic Targets in Cancer Therapy [J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(6): 484-93.
- [50] Kuo C-Y, Ann D K. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance [J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 47.
- [51] Pisanu M E, Maugeri-Saccà M, Fattore L, et al. Inhibition of Stearoyl-CoA desaturase 1 reverts BRAF and MEK inhibition-induced selection of cancer stem cells in BRAF-mutated melanoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 318.
- [52] Li H, Feng Z, He M-L. Lipid metabolism alteration contributes to and maintains the properties of cancer stem cells [J]. Theranostics, 2020, 10(16): 7053-69.
- [53] Tirinato L, Liberale C, Di Franco S, et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging [J]. Stem Cells, 2015, 33(1): 35-44.
- [54] Liu S, Sun Y, Hou Y, et al. A novel lncRNA ROPM-mediated lipid metabolism governs breast cancer stem cell properties [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 178.
- [55] Zhou W, Simpson P J, McFadden J M, et al. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells [J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7330-7.
- [56] Wang H, Klein M G, Zou H, et al. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(7): 581-5.
- [57] Sen U, Coleman C, Sen T. Stearyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis [J]. Trends Cancer, 2023, 9(6): 480-9.
- [58] Tracz-Gaszewska Z, Dobrzyn P. Stearyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(7).
- [59] Mancini R, Noto A, Pisanu M E, et al. Metabolic features of cancer stem cells: the emerging role of lipid metabolism [J]. Oncogene, 2018, 37(18): 2367-78.

学位论文中涉及的 Western 原始数据

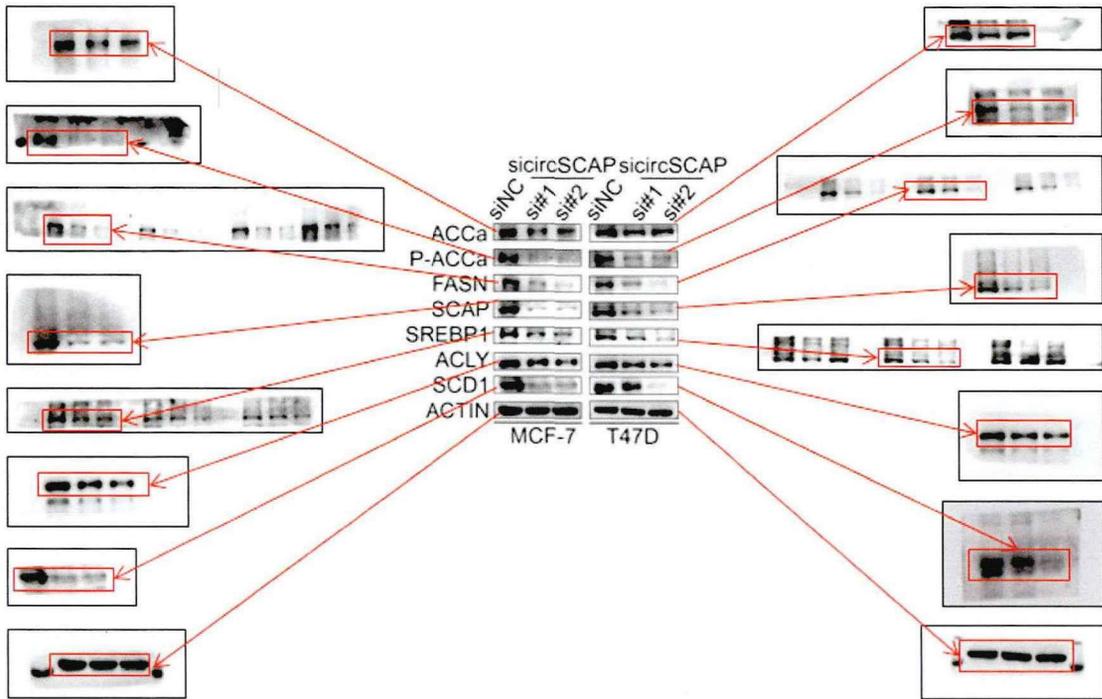
第三部分 图8 D



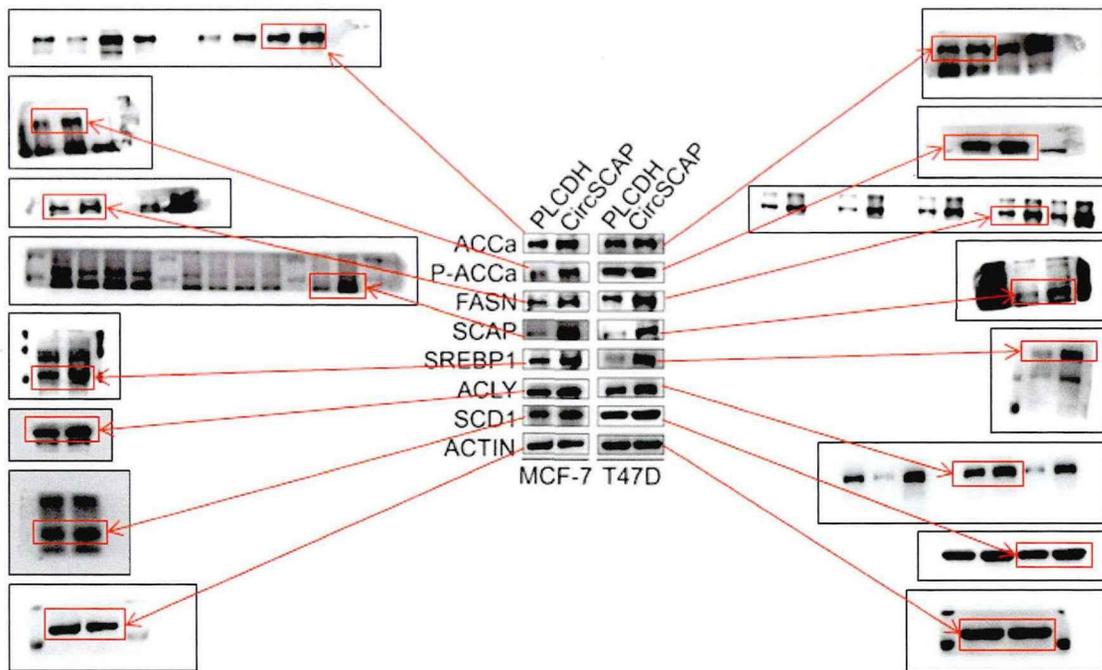
第三部分 图10 E



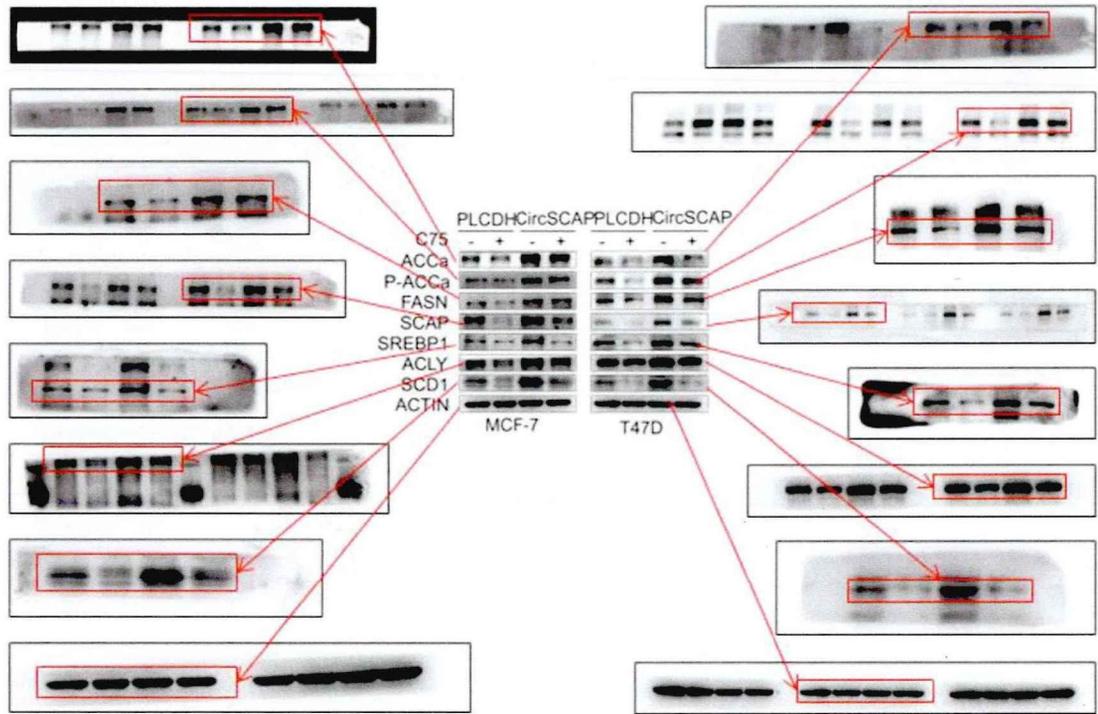
第四部分 图13 A



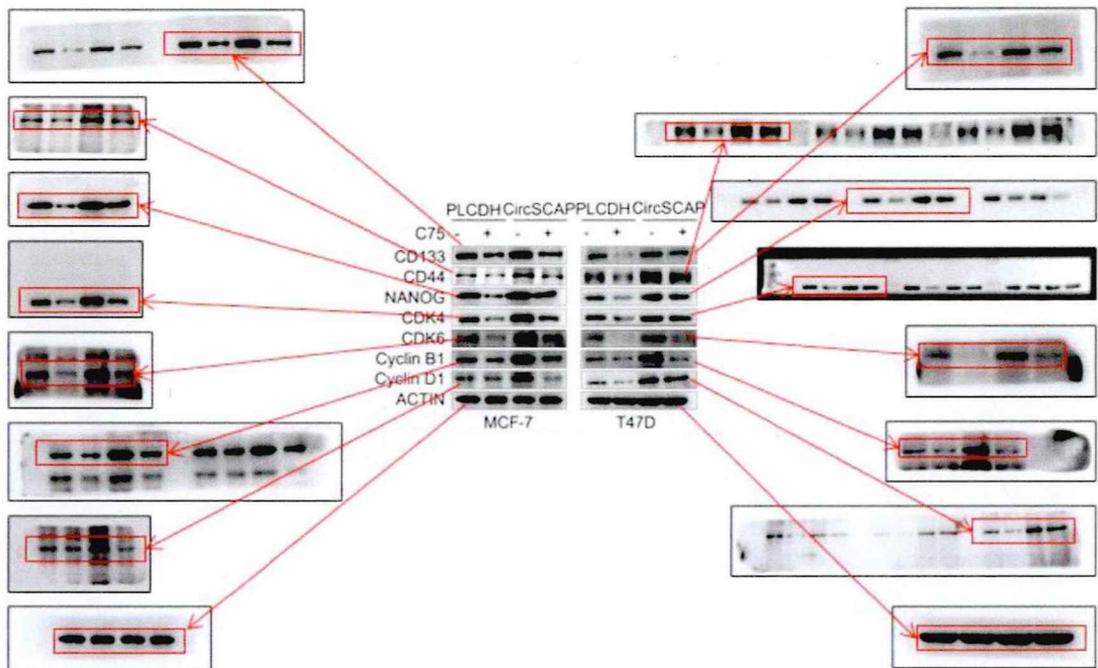
第四部分 图13 B



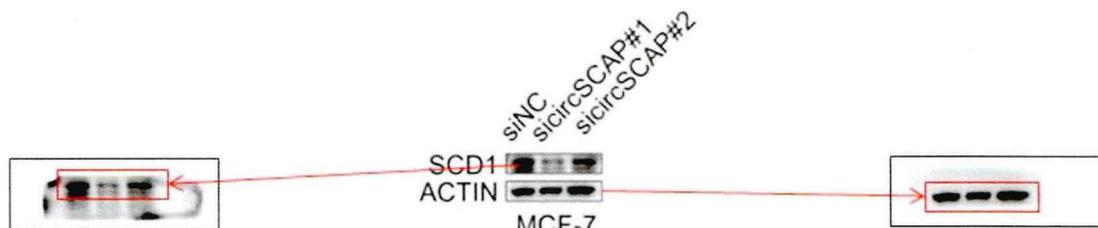
第四部分 图16C



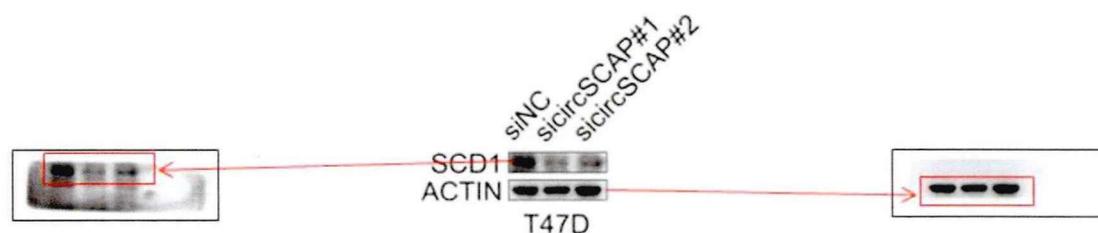
第四部分 图17C



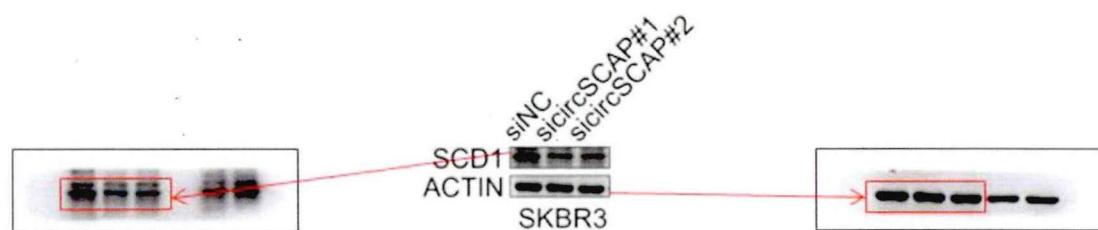
第五部分 图19 E



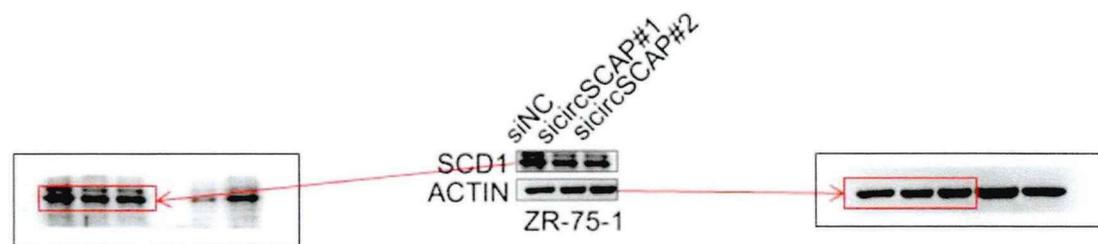
第五部分 图19 F



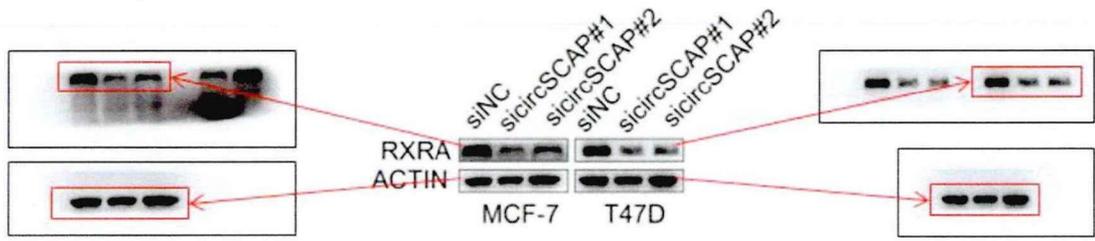
第五部分 图19 G



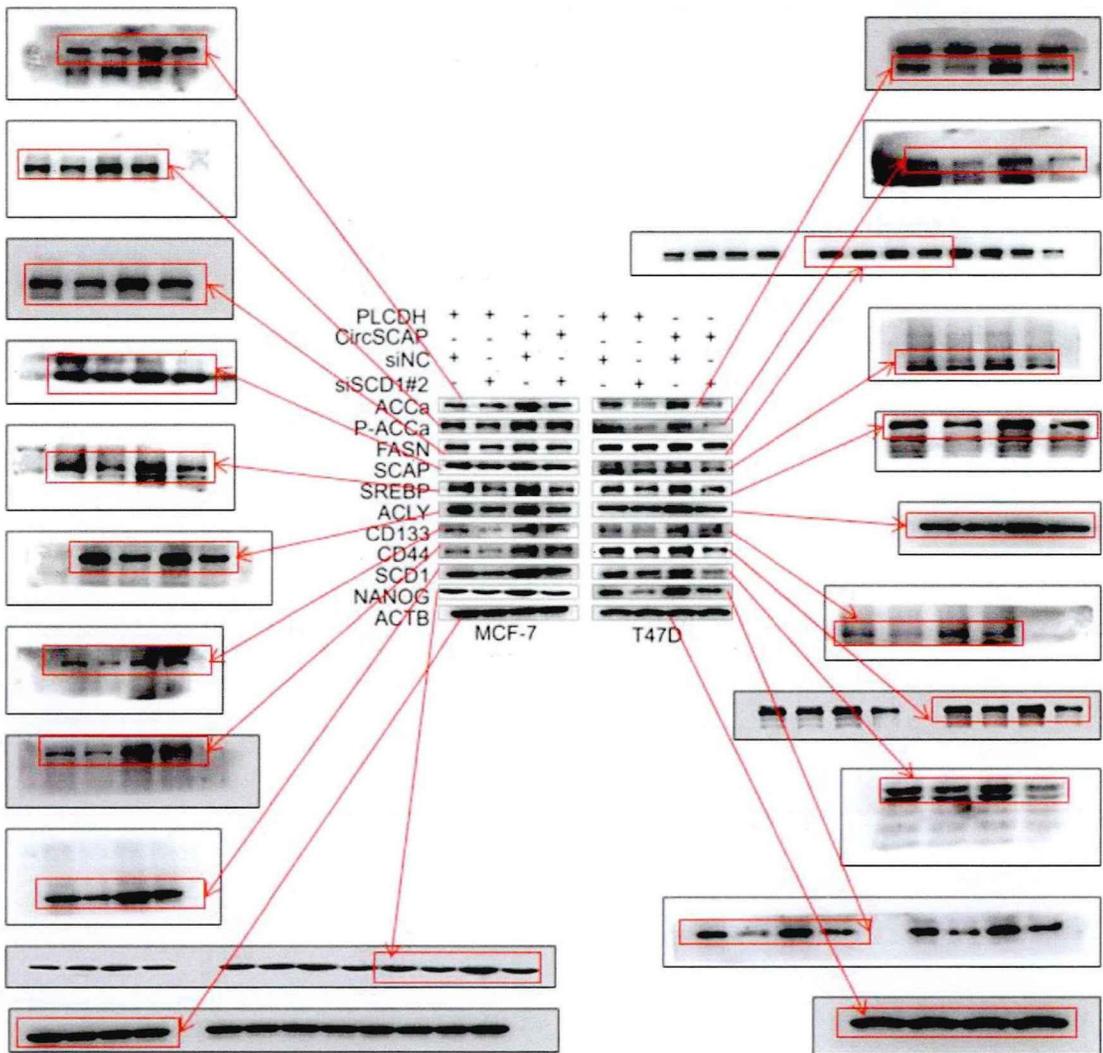
第五部分 图19 H



第五部分 图20 E



第五部分 图21 C



第五部分 图24D

