TIME- AND RATIO-DEPENDENT OPTIMIZATION OF miR-141-3p MIMIC TRANSFECTION IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS

T.T.C. DUONG [1, 3], T.T.N. NGUYEN [1, 2, 3], N.T. NGUYEN [1, 3], L.H. HUYNH [1, 2, 3], H.T. NGUYEN [1, 2, 3] *

[1] Human Genetics Laboratory, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam
[2] Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam
[3] Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam
Corresponding address: nthue@hcmus.edu.vn

Efficient and reproducible delivery of miRNA mimics is essential for functional studies of miRNA-mediated gene regulation in cancer cells. However, transfection outcomes are highly dependent on experimental parameters, particularly post-transfection time and the ratio between miRNA mimics and transfection reagents. We optimized transfection conditions for miR-141-3p mimics in the human breast cancer cell line MCF-7 by evaluating three post-transfection time points (24, 48, and 72 h) and three miRNA mimic:Lipofectamine RNAiMAX ratios (6 : 3, 6 : 4, and 6 : 5). Transfection efficiency was assessed by stem-loop RT-qPCR quantification of miR-141-3p. Cellular responses were evaluated through cell density measurements and expression analysis of established miR-141 target mRNAs (EGFR, HMGB1, and KLF12). miR-141-3p expression was significantly increased in mimic-transfected cells compared with mock and blank controls at all time points, displaying a time-dependent pattern with maximal expression at 48 h post-transfection. Target mRNA expression exhibited concordant temporal changes, with the greatest degree of downregulation observed at 48 h. Optimization of the miRNA mimic:Lipofectamine ratio revealed a progressive increase in miR-141-3p expression with higher Lipofectamine amounts, with the 6 : 5 ratio yielding the highest level of miRNA overexpression and the most pronounced downregulation of target mRNA levels consistent with miRNA-mediated regulatory activity. Cell density analysis indicated moderate, ratio-dependent growth inhibition at higher Lipofectamine amounts, without evidence of overt cytotoxicity. Post-transfection time and miRNA mimic:Lipofectamine ratio critically determine transfection efficiency and downstream regulatory effects in MCF-7 cells. The optimized condition identified here provides a reliable basis for subsequent functional studies of miR-141 in breast cancer.

Key words: *miR-141-3p; miRNA mimic transfection; Lipofectamine RNAiMAX; MCF-7 cells; breast cancer; transfection optimization*

ЗАЛЕЖНІСТЬ ОПТИМІЗАЦІЇ ТРАНСФЕКЦІЇ МІМІКА MIR-141-3P У КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ MCF-7 ВІД ЧАСУ ТА СПІВВІДНОШЕННЯ

Ефективне та відтворюване введення міміків мікроРНК є надзвичайно важливим для функціональних досліджень регуляції генів за участю мікроРНК у ракових клітинах. Однак, результати трансфекції значною мірою залежать від експериментальних параметрів, зокрема від часу після трансфекції та співвідношення між міміками мікроРНК і реагентами для трансфекції. Ми оптимізували умови трансфекції міміків miR-141-3p у клітинній лінії раку молочної залози людини MCF-7, оцінивши три часові точки після трансфекції (24, 48 та 72 год) та три співвідношення міміків міРНК:ліпофектамін RNAiMAX (6 : 3, 6 : 4 та 6 : 5). Ефективність трансфекції оцінювали за допомогою кількісної РТ-кПЛР методом шпильки для miR-141-3p. Клітинні реакції оцінювали шляхом вимірювання щільності клітин та аналізу експресії встановлених цільових мРНК miR-141 (EGFR, HMGB1 та KLF12). Експресія miR-141-3p була значно підвищеною в клітинах, трансфікованих міміком, порівняно з імітаційним контролем та пустим контролем у всі часові точки, демонструючи залежний від часу характер із максимальною експресією через 48 год після трансфекції. Експресія цільових мРНК демонструвала відповідні часові зміни, причому найбільший ступінь негативної регуляції спостерігався через 48 год. Оптимізація співвідношення міміків міРНК:ліпофектаміну виявила прогресивне підвищення експресії miR-141-3p при збільшенні кількості ліпофектаміну, причому співвідношення 6 : 5 забезпечувало найвищий рівень надмірної експресії міРНК та найвиразнішу негативну регуляцію цільової мРНК, що відповідає регуляторній активності, опосередкованій міРНК. Аналіз щільності клітин вказав на помірне інгібування росту, залежне від співвідношення, при вищих кількостях ліпофектаміну, без ознак явної цитотоксичності. Час після трансфекції та співвідношення міміків міРНК:ліпофектаміну є критичними визначальними факторами ефективності трансфекції та подальших регуляторних ефектів у клітинах MCF-7. Визначені тут оптимізовані умови забезпечують надійну основу для подальших функціональних досліджень miR-141 раку молочної залози.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2026

Ключові слова: miR-141-3p; трансфекція міміків міРНК; ліпофектамін RNAiMAX; клітини MCF-7; рак молочної залози; оптимізація трансфекції.

REFERENCES

Abolghasemi, M., Tehrani, S.S., Yousefi, T., Karimian, A., Mahmoodpoor, A., Ghamari, A., Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, M., Kafil, H.S., Bastami, M., Edalati, M., Eyvazi, S., Naghizadeh, M., Targhazeh, N., Yousefi, B., Safa, A., Majidinia, M., and Rameshknia, V., MicroRNAs in breast cancer: Roles, functions, and mechanism of actions, *J. Cell Physiol.*, 2020, vol. 235, pp. 5008–5029. https://doi.org/10.1002/jcp.29396

Albakr, L., Alqahtani, F.Y., Aleanizy, F.S., Alomrani, A., Badran, M., Alhindas, H., and Al-Mohanna, F., Improved delivery of miR-1296 loaded cationic nanoliposomes for effective suppression of triple negative breast cancer, *Saudi Pharm. J.*, 2021, vol. 29, pp. 446–455. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.04.007

Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., Lee, M., and Song, S.J., Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, pp. 1723. https://doi.org/10.3390/ijms21051723

Almohaywi, M., Sugita, B.M., Centa, A., Fonseca A.S., Antunes V.C., Fadda P., Mannion, C.M., Abijo, T., Goldberg, S.L., Campbell, M.C., Copeland, R.L., Kanaan, Y., and Cavalli, L.R., Deregulated miRNA Expression in Triple-Negative Breast Cancer of Ancestral Genomic-Characterized Latina Patients, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, pp. 13046. https://doi.org/10.3390/ijms241713046

Amornsupak, K., Thongchot, S., Thinyakul, C., Box, C., Hedayat, S., Thuwajit, P., Eccles S.A., and Thuwajit, C., HMGB1 mediates invasion and PD-L1 expression through RAGE-PI3K/AKT signaling pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells, *BMC Cancer*, 2022, vol. 22, pp. 578. https://doi.org/10.1186/s12885-022-09675-1

Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., and Brown, B.D., Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells, *Curr. Biol.*, 2011, vol. 21, pp. 369–376. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.067

Benvenuti, C., Tiberio, P., Gaudio, M., Jacobs, F., Saltalamacchia, G., Pindilli, S., Zambelli, A., Santoro, A., and De Sanctis, R., Potential Role of Circulating miRNAs for Breast Cancer Management in the Neoadjuvant Setting: A Road to Pave, 2023, vol. 15, pp. 1410.

Caglayan, S., Hansen, J.-B., and Snir, O., Optimized workflow to modify microRNA expression in primary human intravascular cells, *BMC Immunology*, 2023, vol. 24, pp. 5. https://doi.org/10.1186/s12865-023-00540-9

Clarke, R., Jones, B.C., Sevigny, C.M., Hilakivi-Clarke, L.A., and Sengupta, S., Experimental models of endocrine responsive breast cancer: strengths, limitations, and use, *Cancer Drug. Resist.*, 2021, vol. 4, pp. 762–783. https://doi.org/10.20517/cdr.2021.33

Guo, T.J.F., Liang, W.Y., Singhera, G.K., Memar Vaghri, J., Leung, J.M., and Dorscheid, D.R., Optimization of chemical transfection in airway epithelial cell lines, *BMC Biotechnology*, 2025, vol. 25, pp. 10. https://doi.org/10.1186/s12896-025-00945-x

Han, Z., Ge, X., Tan, J., Chen, F., Gao, H., Lei P., and Zhang, J., Establishment of Lipofection Protocol for Efficient miR-21 Transfection into Cortical Neurons *In Vitro*, *DNA Cell Biol.*, 2015, vol. 34, pp. 703–709. https://doi.org/10.1089/dna.2015.2800

Hausser, J., Syed, A.P., Selevsek, N., van Nimwegen, E., Jaskiewicz, L., Aebersold, R., and Zavolan, M., Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation, *Mol. Syst. Biol.*, 2013, vol. 9, pp. 711. https://doi.org/10.1038/msb.2013.68

Huang, F., Zhao, F., Liang, L.P., Zhou, M., Qu, Z.L., Cao Y.Z., and Lin, C., Optimizing Transfection Efficiency of Cervical Cancer Cells Transfected by Cationic Liposomes LipofectamineTM2000, *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, 2015, vol. 16, pp. 7749–7754. https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.17.7749

Jahanafrooz, Z., Bakhshandeh, B., and Shirzadi, E., Comparative Evaluation of Lipofectamine and Dendrimer for Transfection of Short RNA Into Human T47D and MCF-10A Cell Lines, *Adv. Pharm. Bull.*, 2023, vol. 13, pp. 385–392. https://doi.org/10.34172/apb.2023.022

Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S.R., Macauley, M.S., Rickert, R.C., and Xiao, C., Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution, *Front. Genet.*, 2015, vol. 6, pp. 340. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00340

Kim, H., Lee, Y.-Y., and Kim, V.N., The biogenesis and regulation of animal microRNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2024, vol. 26, pp. 276–296. https://doi.org/10.1038/s41580-024-00805-0

Li, T., Lu, H., Mukherjee, D., Lahiri, S.K., Shen, C., Yu, L., and Zhao, J., Identification of epidermal growth factor receptor and its inhibitory microRNA141 as novel targets of Krüppel-like factor 8 in breast cancer, *Oncotarget.*, 2015, vol. 6, pp. 21428–21442. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4077

Orellana, E.A., Abdelaal, A.M., Rangasamy, L., Tenneti, S., Myoung, S., Low, P.S., and Kasinski, A.L., Enhancing MicroRNA Activity through Increased Endosomal Release Mediated by Nigericin, *Mol. Theor. Nucl. Acids*, 2019, vol. 16, pp. 505–518. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.04.003

Pandey, S., and Yadav, P., Exploring the therapeutic potential of microRNAs: targeted gene regulation strategies for enhanced cancer therapy, *J. Genet. Engineer. Biotechnol.*, 2025, vol. 23, pp. 100556. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2025.100556

Park, H.S., Jang, M.H., Kim, E.J., Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Kim, J.H., Kang, E., Kim, S.-W., Kim I.A., and Park, S.Y., High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer, *Modern Pathology*, 2014, vol. 27, pp. 1212–1222. https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.251

Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., and Bevilacqua, A., Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay, *Biological Procedures Online*, 2017, vol. 19, pp. 8. https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3

Scientific, T.F. (2013). «Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol.» Rev. 1.0. 2026, from https://www.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf.

Sun, S., Ma, J., Xie, P., Wu, Z., and Tian, X., Hypoxia-responsive miR-141-3p is involved in the progression of breast cancer via mediating the HMGB1/HIF-1α signaling pathway, *J. Gene Med.*, 2020, vol. 22, pp. e3230. https://doi.org/10.1002/jgm.3230

Wang, P., Zhou, Y., and Richards, A.M., Effective tools for RNA-derived therapeutics: siRNA interference or miRNA mimicry, *Theranostics*, 2021, vol. 11, pp. 8771–8796. https://doi.org/10.7150/thno.62642

Wang, S., Xu, J., Guo, Y., Cai, Y., Zhu, W., Meng, L., Jiang, C., and Lu, S., Successful Transfection of MicroRNA Mimics or Inhibitors in a Regular Cell Line and in Primary Cells Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis, *Bio. Protoc.*, 2023, vol. 13, pp. e4823. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4823

Wang, T., Larcher, L.M., Ma L., and Veedu, R.N., Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides, *Molecules*, 2018, vol. 23, pp. 2564. https://doi.org/10.3390/molecules 23102564

Wang, Z., Peng, Y., Zhou, H., Zhang, M., Ju, D., and Chen, Z., MiRNA-based drugs: challenges and delivery strategies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2025, vol. 109, pp. 247. https://doi.org/10.1007/s00253-025-13620-0

Zhou, D., Gu, J., Wang, Y., Wu, H., Cheng, W., Wang, Q., Zheng G., and Wang, X., Long non-coding RNA NEAT1 transported by extracellular vesicles contributes to breast cancer development by sponging microRNA-141-3p and regulating KLF12, *Cell Biosci.*, 2021, vol. 11, pp. 68. https://doi.org/10.1186/s13578-021-00556-x

Received February 20, 2026
Received March 26, 2026
Accepted July 18, 2026