

# LncRNA01004 通过上调 CPSF1 蛋白表达促进上皮 - 间质转化加速乳腺癌细胞恶性进展的研究

郭宏果<sup>a</sup>, 吴楠<sup>b</sup>, 陆婉玲<sup>a</sup>, 刘军<sup>a</sup>, 程才<sup>a</sup> (中国人民解放军空军第九八六医院 a. 肿瘤血液科; b. 普通外科, 西安 710054)

**摘要:** **目的** 研究长链非编码 RNA 01004 (LncRNA01004) 加速乳腺癌细胞恶性进展的作用及潜在调节机制。 **方法** 通过实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测乳腺癌组织和细胞中 LncRNA01004 表达水平。通过 StarBase 在线数据库预测 LncRNA01004 的结合蛋白, 通过 RNA 结合蛋白免疫沉淀反应 (RIP) 分析进行验证。采用 LncRNA01004 干扰序列 (sh-LncRNA01004) 或过表达载体 (LncRNA01004) 转染 MCF-7 细胞, 或与剪切多聚腺苷酸化特异性因子 1 (CPSF1) 干扰序列 (sh-CPSF1) 共转染 MCF-7 细胞。CCK-8 法、Transwell 和流式细胞术 (FCM) 分别检测细胞活力、细胞侵袭和凋亡。qRT-PCR 检测 LncRNA01004 和 CPSF1 过表达和沉默效率; 蛋白质印迹 (WB) 检测 CPSF1 蛋白、凋亡相关蛋白 [B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)], 以及上皮-间质转化 (EMT) 相关蛋白 [上皮钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、锌指转录因子 (Snail)] 水平; ELISA 检测半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 活性。 **结果** 与癌旁组织相比, LncRNA01004 在乳腺癌组织 ( $5.14 \pm 0.33$  vs  $1.02 \pm 0.03$ ) 中显著上调, 差异具有统计学意义 ( $t = -78.637, P < 0.001$ ); 乳腺癌细胞中 LncRNA01004 表达亦明显高于正常人乳腺上皮细胞, 组间差异具有统计学意义 ( $F = 142.248, P < 0.001$ )。与 Control 组相比, 沉默 LncRNA01004 显著抑制 MCF-7 细胞活力 ( $42.15 \pm 2.11$  vs  $100.02 \pm 0.65$ ) 和侵袭 ( $18.65\% \pm 1.44\%$  vs  $41.36\% \pm 1.57\%$ ), 诱导细胞凋亡 ( $16.58\% \pm 1.52\%$  vs  $5.24\% \pm 1.12\%$ ), 升高 Caspase-3 活性 ( $2.93 \pm 0.71$  vs  $1.51 \pm 0.43$ ) 和 Bax 蛋白 ( $2.74 \pm 0.39$  vs  $1.01 \pm 0.02$ ) 表达, 抑制 Bcl-2 蛋白 ( $0.32 \pm 0.07$  vs  $1.02 \pm 0.03$ ) 表达, 差异具有统计学意义 ( $t = 3.075 \sim 19.332$ , 均  $P < 0.05$ )。与 Control 组相比, 沉默 LncRNA01004 显著升高 E-cadherin ( $3.06 \pm 0.37$  vs  $1.01 \pm 0.02$ ) 蛋白水平, 降低 N-cadherin ( $0.44 \pm 0.11$  vs  $1.00 \pm 0.01$ ), Vimentin ( $0.39 \pm 0.13$  vs  $1.02 \pm 0.03$ ) 和 Snail ( $0.30 \pm 0.08$  vs  $1.01 \pm 0.03$ ) 蛋白水平, 差异具有统计学意义 ( $t = 9.989 \sim 17.164$ , 均  $P < 0.05$ )。LncRNA01004 与 CPSF1 结合并促进 CPSF1 蛋白表达。沉默 CPSF1 抑制 MCF-7 细胞增殖和侵袭、诱导细胞凋亡, 抵消 LncRNA01004 过表达对 MCF-7 细胞生物学功能的影响。 **结论** LncRNA01004 可能通过上调 CPSF1 促进 EMT, 进而促进乳腺癌细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡, 参与乳腺癌的恶性进展。

**关键词:** 乳腺癌; 长链非编码 RNA 01004; 剪切多聚腺苷酸化特异性因子 1; 上皮-间质转化; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2025) 01-032-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.01.06

## Study on LncRNA01004 Promoting Epithelial-mesenchymal Transformation and Accelerating Malignant Progression of Breast Cancer Cells through Up-regulation of CPSF1 Protein Expression

GUO Hongguo<sup>a</sup>, WU Nan<sup>b</sup>, LU Wanling<sup>a</sup>, LIU Jun<sup>a</sup>, CHENG Cai<sup>a</sup> (a. Department of Oncology and Hematology; b. Department of General Surgery, the 986th Hospital of the Air Force of the Chinese People's Liberation Army, Xi'an 710054, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of long non-coding RNA 01004 (LncRNA01004) in accelerating the malignant progression of breast cancer cells and its potential regulatory mechanism. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of LncRNA01004 in breast cancer tissues and cells. The Starbase online database predicted the binding of LncRNA01004 to CPSF1 and verified it through RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) analysis. MCF-7 cells were transfected with LncRNA01004 interference sequence (sh-LncRNA01004) or overexpressed vector (LncRNA01004), or co-transfected with Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 1 (CPSF1) interference sequence (sh-CPSF1). Cell viability, invasion and apoptosis were detected with CCK-8, Transwell and flow cytometry (FCM). The overexpression and silencing efficiency of LINC01004 and CPSF1 were detected by qPCR. Western blot (WB) analysis of CPSF1 protein, apoptosis-related protein [B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 Associated X (Bax)] and

作者简介: 郭宏果 (1979-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 乳腺癌、妇科肿瘤, E-mail: guohongguo\_986@163.com.

通讯作者: 吴楠 (1991-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 乳腺癌、甲状腺癌治疗, E-mail: 617302210@qq.com.

Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) related protein[Epithelial-cadherin(E-cadherin), Nerve-cadherin(N-cadherin), Vimentin, zinc-finger transcription factor(Snail)], and the activity of Cysteiny aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** LncRNA01004 was significantly up-regulated in breast cancer tissues ( $5.14 \pm 0.33$ ) compared with paracancer tissues ( $1.02 \pm 0.03$ ), with the statistically significant difference ( $t=-78.637$ ,  $P<0.001$ ); LncRNA01004 expression in breast cancer cells was significantly higher than that in normal breast epithelial cells, the difference between groups is statistically significant ( $F=142.248$ ,  $P<0.001$ ). Compared with the Control group, LncRNA01004 significantly inhibited the proliferation ( $42.15 \pm 2.11$  vs  $100.02 \pm 0.65$ ) and invasion ( $18.65\% \pm 1.44\%$  vs  $41.36\% \pm 1.57\%$ ) of MCF-7 cells, induced apoptosis ( $16.58\% \pm 1.52\%$  vs  $5.24\% \pm 1.12\%$ ), increased the activity of Caspase-3 ( $2.93 \pm 0.711$  vs  $51 \pm 0.43$ ) and the expression of Bax ( $2.74 \pm 0.39$  vs  $1.01 \pm 0.02$ ) protein, and inhibited the expression of Bcl-2 ( $0.32 \pm 0.07$  vs  $1.02 \pm 0.03$ ) protein, with the statistically significant difference ( $t=3.075 \sim 19.332$ , all  $P<0.05$ ). Significantly increased compared with Control group, the silent LncRNA01004 E-cadherin ( $3.06 \pm 0.37$  vs  $1.01 \pm 0.02$ ) protein levels, lower N-cadherin ( $0.44 \pm 0.11$  vs  $1.00 \pm 0.01$ ), Vimentin ( $0.39 \pm 0.13$  vs  $1.02 \pm 0.03$ ) and Snail( $0.30 \pm 0.08$  vs  $1.01 \pm 0.03$ ) protein levels, with the statistically significant difference ( $t=9.989 \sim 17.164$ , all  $P<0.05$ ).LncRNA01004 binds to CPSF1 and promotes CPSF1 protein expression.Silencing CPSF1 inhibited the proliferation and invasion of MCF-7 cells, induced cell apoptosis, and counteracted the effect of LncRNA01004 overexpression on MCF-7 cells. **Conclusion** LncRNA01004 may promote EMT through up-regulation of CPSF1, and then promote proliferation and invasion of breast cancer cells, inhibit cell apoptosis, and participate in the malignant progression of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; long non-coding RNA 01004; cleavage and polyadenylation specific factor 1; epithelial-mesenchymal transition; proliferation; invade; apoptosis

乳腺癌是世界范围内女性癌症相关死亡的主要原因, 尽管乳腺癌的研究在诊断和联合治疗方面取得了进展, 但患者预后仍不理想<sup>[1]</sup>。因此, 基于分子生物学阐明乳腺癌发病机制, 开发新的分子治疗靶标至关重要<sup>[2-3]</sup>。近年研究证实, 长链非编码 RNA (LncRNAs) 在染色质重塑、转录调节和翻译后修饰中发挥重要作用, 在肿瘤进展中作为癌基因或抑癌基因扮演重要角色<sup>[4-7]</sup>。LncRNA01004 是新发现的 LncRNAs, 研究表明其可通过多种途径调控肿瘤细胞的增殖和转移, 参与肝癌、食管鳞状细胞癌、垂体腺瘤等<sup>[8-10]</sup> 人类多种肿瘤的发生。剪切多聚腺苷酸化特异性因子 1 (cleavage and polyadenylation specific factor 1, CPSF1) 是剪切性聚腺苷化 (alternative polyadenylation, APA) 相关因子的关键成员之一, 报道显示 CPSF1 通过调节 APA 事件的发生可促进肿瘤细胞增殖、化疗抗性, 与肿瘤发生发展关系密切<sup>[11-12]</sup>。有研究表明 CPSF1 过表达与肝细胞癌患者预后不良相关<sup>[13]</sup>; CPSF1 通过调节 NAD(P) 类固醇脱氢酶样蛋白 [NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like, NSDHL] 表达促进胃癌进展<sup>[14]</sup>; CPSF1 通过 APA 调节 p62 的 3'UTR, 可诱导乳腺癌细胞的 p62 依赖性化疗耐药性<sup>[12,15]</sup>。目前研究对 LncRNA01004 和 CPSF1 作用探究仍不完全, 其两者在乳腺癌中的调节机制亦不清楚。因此本研究通过功能获得和丧失实验探究了 LncRNA01004, CPSF1 在乳腺癌中的作用及其调控肿瘤细胞恶性进展的可能机制, 旨在加深对乳腺癌发病的了解, 为临床治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2022 年 7 月 ~ 2023 年 10 月在中国人民解放军空军第九八六医院确诊的 40 例乳腺癌患者, 手术采集癌灶组织和相邻正常组织标本。所有患者经病理诊断为乳腺癌, 术前未接受过放化疗治疗, 无并发其他恶性肿瘤。本研究经医院伦理委员会批准 (批号: 20230516), 并取得所有患者及其家属签署的书面知情同意书。从上海细胞库获得正常人乳腺上皮细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞系 MDAMB231, T47D, ZR7530, MDAMB468 和 MCF7, 所有细胞系均经短串联重复序列鉴定。

**1.2 主要材料和仪器** DMEM 培养液、胎牛血清和 Trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司); 细胞转染试剂 Lipofectamine 3000<sup>TM</sup> (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); RIPA 裂解缓冲液, BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Anti-CPSF1, Anti-Bax, Anti-Bcl-2, Anti-GAPDH 和羊抗鼠 IgG 抗体 (Abcam 公司); 电化学发光 (ECL) 试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); 细胞计数试剂盒-8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 和 FITC-Annexin V 试剂盒 (日本 Dojindo); 半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteinyl aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3) 活性测定试剂盒 (中国南京建成生物工程研究所); LncRNA01004 小干扰 shRNA 序列 (sh-LncRNA01004) 和过表达载体 (LncRNA01004), CPSF1 的 shRNA (sh-CPSF1) 均由 GenePharma (上海) 公司制

备。Thermo Varioskan™ LUX 多功能酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；倒置普通光学显微镜（日本 OLYMPUS 公司）；Centrifuge5804R 型高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；免疫印记系统（美国 BioRad 公司）；凝胶成像分析系统（Bio-Imaging Systems 公司）；实时荧光定量 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组：所有细胞均使用含有 10g/dl 胎牛血清，100U/ml 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液，在 37℃，5%（v/v）的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，当密度达到 90% 时，进行传代。将 MCF-7 细胞分为空白对照组（Control 组，不做任何转染处理）、NC shRNA 组（转染 LncRNA01004 阴性对照 shRNA 序列）、sh-LncRNA01004 组（转染 LncRNA01004 小干扰 shRNA 序列）、Vector+NC shRNA 组（共转染 LncRNA01004 过表达空载体 + CPSF1 阴性对照 shRNA 序列）、LncRNA01004 组（转染 LncRNA01004 过表达载体）、sh-CPSF1 组（转染 CPSF1 小干扰 shRNA 序列）和 LncRNA01004+sh-CPSF1 组（共转染 LncRNA01004 过表达载体 + CPSF1 shRNA 序列）。按照 Lipofectamine 3000™ 转染试剂盒转染相应载体或序列到各组细胞中，48h 后收集细胞进行后续实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测 LncRNA01004 和 CPSF1 相对表达：使用 Trizol 提取总 RNA，后使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，使用 SYBR Green 进行 qPCR。反应条件：95℃ 5min，95℃ 60s，72℃ 30s，72℃ 60s，共 40 个循环。引物序列：LncRNA01004 正向引物：5'-TATATCTAAATACATCCTGCACCCCTTATCA-3'，反向引物：5'-CACGACAACCTGTATCTTTGATAATTACAG-3'；CPSF1 正向引物：5'-AATGAACAAAACCTCATTCTGGACTCATTGC-3'，反向引物：5'-GACTCGTCCAATGTATGATGAGCTACGGT T-3'；内参 GAPDH 正向引物：5'-GCGAGCTCCCAGATTCC-3'，反向引物：5'-CCAGACGAAATTTGCTCTG T-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算目的基因相对表达水平。

1.3.3 Western blot 检测 CPSF1, Bax, Bcl-2, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail 蛋白水平：使用 RIPA 提取总蛋白，BCA 试剂盒检测浓度。在 SDS-PAGE 上分离蛋白样品，并转移到 PVDF 膜上，将膜用 5g/dl 脱脂牛奶室温封闭 1h，加入待测蛋白一抗 4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 清洗，将膜与二抗在室温下孵育 1h，TBST 清洗。采用 ECL 试剂盒在凝胶成像系统上对蛋白条带进行可视化，并用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值分析。

1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖活力：将细胞以 5 × 10<sup>3</sup> 个/

孔的密度接种到 96 孔板中，分别在培养 48h 后，将 10μl 的 CCK-8 溶液加入每孔中，37℃ 继续培养 2h，使用酶标仪在 450 nm 处测量每孔的光密度值（A 值）。

1.3.5 细胞凋亡检测：采用膜联蛋白 V+/碘化丙啶（Annexin V/PI）流式细胞术检测细胞凋亡。将 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔的细胞收集，按照 FITC-Annexin V 试剂盒说明书用 Annexin V/P 染色细胞 15 min，然后采用流式细胞术对标记的细胞进行分析。

1.3.6 Transwell 检测细胞侵袭能力：将细胞接种于含 200μl 无血清培养液的 Transwell 上室中，在下室加入含 10g/dl 胎牛血清的培养液，孵育 24h 后，对下室中的细胞进行固定，并用结晶紫染色。随机选取 5 个视野拍照，在显微镜下计数。

1.3.7 Caspase-3 活性测定：将细胞以 5 × 10<sup>3</sup> 个细胞/孔接种在 96 孔板中，在 37℃，5%（v/v）的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，根据制造商说明书使用 Caspase-3 活性测定试剂盒测定 Caspase-3 活性水平。

1.3.8 RNA 结合蛋白免疫沉淀（RNA binding protein immunoprecipitation, RIP）分析：采用 RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒进行检测。将转染后的细胞加入裂解缓冲液进行裂解，然后将裂解物与 Anti-CPSF1 或阴性对照 IgG 抗体偶联的磁珠进行孵育 30 min。用蛋白酶 K 消化这些小珠子中的蛋白质和 RNA，通过 qRT-PCR 检测免疫沉淀 RNA，观察 LINC01004 富集水平。

1.4 统计学分析 采用 SPSS.22.0 软件进行分析。所有实验均重复三次取平均值，数据以均数 ± 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较用 Student-t 检验，多组间比较用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验；癌灶组织及相邻正常组织间比较采用配对 t 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LncRNA01004 在乳腺癌组织和细胞中表达上调 与癌旁正常组织相比，乳腺癌组织中 LncRNA01004（5.14 ± 0.33 vs 1.02 ± 0.03）相对表达显著上调，差异具有统计学意义（t = -78.637，P < 0.001）。此外，与正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A（1.01 ± 0.02）相比，人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231（3.11 ± 0.15），T47-D（2.47 ± 0.12），ZR-75-30（2.61 ± 0.14），MDA-MB-468（3.20 ± 0.21）和 MCF-7（4.15 ± 0.19）中 LncRNA01004 表达水平也显著升高，差异具有统计学意义（F = 142.248，P < 0.001），研究选择表达水平最高的 MCF-7 细胞用于后续研究。

2.2 沉默 LncRNA01004 抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭、诱导细胞凋亡 见表 1。qRT-PCR 检测显示，与 Control 组和 NC shRNA 组细胞相比，sh-LncRNA01004



组细胞中 LncRNA01004 表达显著降低 ( $t=18.486$ , 19.092,  $P<0.001$ ), 表明沉默 LncRNA01004 的细胞系构建成功。CCK-8 法、Transwell 及流式细胞术检测显示, 沉默 LncRNA01004 显著抑制了 MCF-7 细胞

活力和细胞侵袭, 促进细胞凋亡 ( $t=18.486$ , 19.020, 10.856); 沉默 LncRNA01004 显著升高 Caspase-3 活性和 Bax 蛋白水平, 降低 Bcl-2 蛋白水平 ( $t=3.075$ , 9.385, 19.332), 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

| 表 1 沉默 LncRNA01004 对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ) |               |              |                   |         |        |
|---|---------------|--------------|-------------------|---------|--------|
| 项目  | Control 组     | NC shRNA 组   | sh- LncRNA01004 组 | F 值     | P 值    |
| LncRNA01004 表达  | 1.00 ± 0.02   | 1.02 ± 0.03  | 0.39 ± 0.06       | 235.531 | <0.001 |
| 细胞活力 (A 值)  | 100.02 ± 0.65 | 99.87 ± 0.58 | 42.15 ± 2.11      | 923.016 | <0.001 |
| 细胞侵袭率 (%)   | 41.36 ± 1.57  | 41.12 ± 1.37 | 18.65 ± 1.44      | 238.653 | <0.001 |
| 细胞凋亡率 (%)   | 5.24 ± 1.12   | 5.31 ± 1.16  | 16.58 ± 1.52      | 78.083  | <0.001 |
| Caspase-3 活性  | 1.51 ± 0.43   | 1.56 ± 0.52  | 2.93 ± 0.71       | 6.091   | <0.05  |
| Bax 蛋白  | 1.01 ± 0.02   | 1.03 ± 0.02  | 2.74 ± 0.39       | 58.052  | <0.001 |
| Bcl-2 蛋白  | 1.02 ± 0.03   | 1.00 ± 0.01  | 0.32 ± 0.07       | 242.237 | <0.001 |

2.3 沉默 LncRNA01004 抑制乳腺癌细胞的上皮 - 间质转化 见表 2。Western blot 检测显示, 与 Control 组相比, 沉默 LncRNA01004 显著升高 MCF-7 细

胞中 E-cadherin 蛋白水平, 降低 N-cadherin, Vimentin, Snail 蛋白水平, 差异具有统计学意义 ( $t=11.668$ , 10.711, 9.989, 17.164,  $P<0.05$ )。

| 表 2 沉默 LncRNA01004 对乳腺癌细胞上皮 - 间质转化相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ) |             |             |                  |         |        |
|--|-------------|-------------|------------------|---------|--------|
| 项目   | Control 组   | NC shRNA 组  | sh-LncRNA01004 组 | F 值     | P 值    |
| E-cadherin 蛋白  | 1.01 ± 0.02 | 1.03 ± 0.04 | 3.06 ± 0.37      | 89.890  | <0.001 |
| N-cadherin 蛋白  | 1.00 ± 0.01 | 1.02 ± 0.01 | 0.44 ± 0.11      | 79.317  | <0.001 |
| Vimentin 蛋白  | 1.02 ± 0.03 | 1.01 ± 0.01 | 0.39 ± 0.13      | 65.480  | <0.001 |
| Snail 蛋白   | 1.01 ± 0.03 | 1.02 ± 0.02 | 0.30 ± 0.08      | 199.208 | <0.001 |

2.4 LncRNA01004 与 CPSF1 蛋白结合并促进其稳定性 研究通过 Starbase 在线数据库预测发现, LncRNA01004 序列上存在 CPSF1 蛋白基序的结合位点, 见图 1A。RIP 分析进行验证, 发现 anti-CPSF1 抗体下拉的复合物中 LncRNA01004 显著富集, 见图 1B。此外发现, 乳腺癌组织中 CPSF1 蛋白 ( $1.01\pm0.03$ ) 表达明显高于癌旁组织 ( $2.95\pm0.23$ ), 差异具有统计学意义 ( $t=52.898$ ,  $P<0.001$ ), 见图 1C。采用 LncRNA01004 过表达载体转染 MCF-7 细胞, 发现与转染 Vector 组细胞相比, 过表达 LncRNA01004 显著升高

CPSF1 蛋白 ( $2.47\pm0.31$  vs  $1.02\pm0.03$ ) 水平 ( $t=8.064$ ,  $P<0.05$ ), 但对 CPSF1 mRNA ( $1.01\pm0.02$  vs  $1.03\pm0.04$ ) 水平没有影响 ( $t=-0.775$ ,  $P>0.05$ ), 见图 1D ~ F, 推测 LncRNA01004 可能影响 CPSF1 蛋白的稳定性。使用蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺 (CHX) 处理用 NC shRNA 和 sh-LncRNA01004 转染的 MCF-7 细胞, 结果显示 NC shRNA 转基因细胞中 CPSF1 蛋白在 30h 内稳定表达, 而在 sh-LncRNA01004 转染细胞中显著下调, 见图 1G。由此说明, LncRNA01004 通过与 CPSF1 蛋白结合促进其稳定性, 上调 CPSF1 蛋白水平。

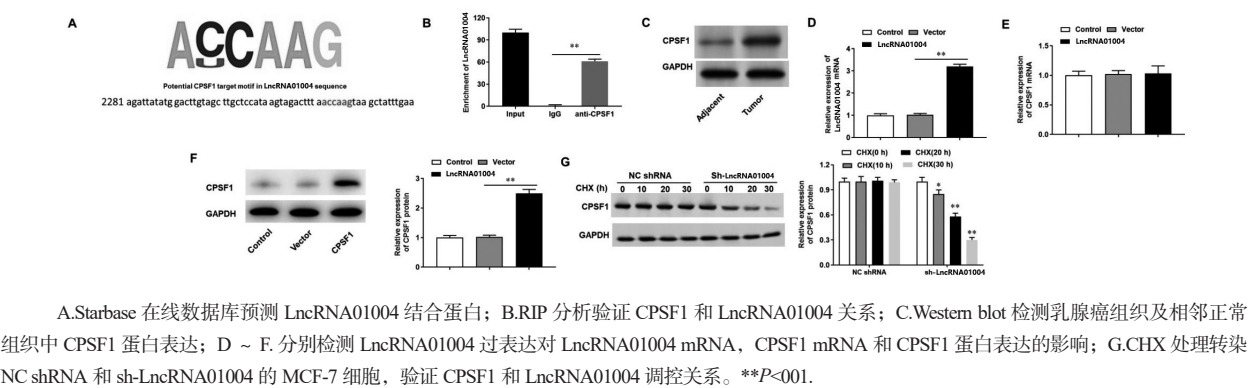


图 1 LncRNA01004 与 CPSF1 蛋白结合并促进其稳定性

2.5 LncRNA01004 通过上调 CPSF1 蛋白表达促进 乳腺癌细胞的上皮 - 间质转化 见表 3。Western blot

检测显示,与 Vector+NC shRNA 组相比,过表达 LncRNA01004 显著降低 MCF-7 细胞中的 E-cadherin 蛋白水平,升高 N-cadherin, Vimentin 和 Snail 蛋白水平( $t=3.631, 11.475, 11.770, 10.985$ , 均  $P<0.05$ );而沉默 CPSF1 显著升高 E-cadherin 蛋白水平,降低

N-cadherin, Vimentin 和 Snail 蛋白水平( $t=9.323, 3.694, 3.685, 3.533$ , 均  $P<0.05$ ),沉默 CPSF1 抵消了 LncRNA01004 过表达对上皮-间质转化相关蛋白表达的影响( $t=4.890, 9.068, 10.849, 10.211$ , 均  $P<0.05$ )。

表 3 LncRNA01004 上调 CPSF1 对乳腺癌细胞上皮-间质转化相关蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 项目            | Vector+NC shRNA 组 | LncRNA01004 组 | sh-CPSF1 组 | LncRNA01004+ sh-CPSF1 组 | F 值    | P 值    |
|---------------|-------------------|---------------|------------|-------------------------|--------|--------|
| E-cadherin 蛋白 | 1.01±0.03         | 0.27±0.05     | 2.91±0.33  | 1.25±0.37               | 59.795 | <0.001 |
| N-cadherin 蛋白 | 1.00±0.01         | 3.05±0.29     | 0.34±0.07  | 1.43±0.32               | 83.444 | <0.001 |
| Vimentin 蛋白   | 1.02±0.03         | 3.32±0.36     | 0.30±0.05  | 1.20±0.31               | 88.457 | <0.001 |
| Snail 蛋白      | 1.01±0.02         | 3.28±0.41     | 0.28±0.06  | 1.17±0.29               | 77.891 | <0.001 |

2.6 LncRNA01004 通过上调 CPSF1 蛋白表达促进乳腺癌细胞增殖和侵袭,抑制细胞凋亡 见表 4。结果显示,与 Vector+NC shRNA 组相比,过表达 LncRNA01004 显著升高 MCF-7 细胞活力,促进细胞侵袭,抑制细胞凋亡( $t=36.434, 11.301, 3.006$ , 均  $P<0.05$ ),沉默 CPSF1 显著逆转了 LncRNA01004 过表达对 MCF-7 细胞生物学行为的

影响( $t=26.913, 13.468, 6.894$ , 均  $P<0.05$ )。此外发现,过表达 LncRNA01004 显著降低 Caspase-3 活性和 Bax 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白水平( $t=2.550, 2.622, 9.247$ , 均  $P<0.05$ ),沉默 CPSF1 显著逆转了 LncRNA01004 过表达对细胞凋亡相关蛋白表达的影响( $t=2.923, 3.496, 7.722$ , 均  $P<0.05$ ),

表 4 LncRNA01004 上调 CPSF1 对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 项目           | Vector+NC shRNA 组 | LncRNA01004 组 | sh-CPSF1 组  | LncRNA01004+ sh-CPSF1 组  | F 值     | P 值    |
|--------------|-------------------|---------------|-------------|--------------------------|---------|--------|
| 细胞活力(A 值)    | 100.03±0.58       | 194.32±4.57*  | 51.26±1.32* | 124.67±4.15 <sup>#</sup> | 951.631 | <0.001 |
| 细胞侵袭率(%)     | 36.79±1.25        | 49.57±1.68*   | 19.66±1.14* | 34.34±1.41 <sup>#</sup>  | 235.231 | <0.001 |
| 细胞凋亡率(%)     | 5.24±1.03         | 2.21±0.87*    | 17.69±1.55* | 9.16±1.37 <sup>#</sup>   | 88.605  | <0.001 |
| Caspase-3 活性 | 1.49±0.38         | 0.67±0.09*    | 3.30±0.54*  | 1.61±0.42 <sup>#</sup>   | 23.561  | <0.001 |
| Bax 蛋白       | 1.04±0.05         | 0.35±0.07*    | 3.06±0.49*  | 1.27±0.41 <sup>#</sup>   | 38.508  | <0.001 |
| Bcl-2 蛋白     | 1.01±0.04         | 2.95±0.34*    | 0.44±0.05*  | 1.33±0.38 <sup>#</sup>   | 52.660  | <0.001 |

注:与 Vector+NC shRNA 组相比,\* $t=36.434, 18.845; 11.301, 15.148; 3.006, 12.350; 2.550, 5.628; 2.662, 7.675; 9.247, 2.717$ , 均  $P<0.05$ ;与 LncRNA01004 组和(或) sh-CPSF1 组相比,<sup>#</sup> $t=26.913, 13.468, 6.894, 2.923, 3.496, 7.222$ , 均  $P<0.05$ 。

3 讨论

近年精准手术、辅助化疗甚至免疫治疗已经大大提高了乳腺癌总体生存率,但患者的预后仍不理想。当前抗癌治疗主要基于临床、病理和分子特征,迫切需要一种预测诊断、预后和化疗敏感性的新方法<sup>[3,16]</sup>。因此,筛选更有效的生物标志物至关重要。

随着高通量测序技术的发展,越来越全面的转录组被识别和鉴定,其中 LncRNA 的作用受到关注和研究<sup>[17-18]</sup>。研究表明,LncRNAs 可以通过调节多种生物过程,如蛋白的转录过程、染色质修饰、转录激活、转录调控等,调控基因异常表达,参与肿瘤的发生发展,是新的生物标志物和肿瘤治疗的有效靶点<sup>[19-20]</sup>。LncRNA01004 是近年研究的热点 LncRNA,大量研究已证实其与人类多种恶性肿瘤的发生发展及患者预后不良相关,为肿瘤研究提供了新的靶点。而本研究发现沉默 LncRNA01004 表达可以抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭,诱导细胞凋

亡,与研究报道的 LncRNA01004 作用相一致,扮演癌基因发挥作用。

CPSF1 是 APA 的主要调节因子之一,研究表明 APA 调节因子介导的 APA 机制与癌症密切相关,如 KANG 等<sup>[14]</sup>研究显示,胃癌中 CPSF1 显著上调与患者预后不良密切相关。MAYRO 等<sup>[21]</sup>发现肺癌中 CPSF1 不仅作为 E3 连接酶发挥作用,还可作为 APA 调节因子,调节缺氧诱导因子 1- $\alpha$  和原癌基因 MYC 蛋白稳定性,参与肿瘤发生。SAKAI 等<sup>[22]</sup>发现 CPSF1 异常表达通过调节选择性剪接促进头颈鳞状细胞癌的肿瘤进展,是重要的靶基因。与上述研究一致,本研究亦证实沉默 CPSF1 可以抑制癌细胞增殖和侵袭,诱导细胞凋亡,发挥癌基因作用。为明确 LINC01004 与 CPSF1 是否存在可能调控机制,研究通过 Starbase 在线数据库预测且证实两者存在靶向结合位点,且发现沉默 CPSF1 可以逆转 LncRNA01004 过表达对乳腺癌细胞生物学行

为的影响,表明 LncRNA01004 通过上调 CPSF1 表达发挥作用。

上皮-间质转化(EMT)是细胞减少或失去细胞间黏附、经历去极化并转化为具有间充质特征的细胞的过程<sup>[23]</sup>。EMT也是参与胚胎发育的关键生物学现象,其特征调节肿瘤侵袭和转移。当肿瘤细胞经历EMT时,细胞间的黏附、侵袭和迁移能力发生显著改变,为肿瘤远处转移奠定了基础条件<sup>[24-25]</sup>。EMT还可以使癌细胞获得自我更新能力以及对化疗的耐受性特征<sup>[26]</sup>。一般认为,EMT驱动包括乳腺癌在内的各类肿瘤的侵袭和迁移,EMT过程中上皮细胞相关分子标记物(如E-cadherin)表达通常会减少,而间充质标记物(如N-cadherin, Vimentin)表达会增加<sup>[27]</sup>。在本研究中发现,LncRNA01004或CPSF1表达均会显著影响EMT相关蛋白水平,LncRNA01004可能通过上调CPSF1表达促进乳腺癌细胞EMT,促进肿瘤进展。然而本研究仅在体外细胞模型中进行了结论验证,LncRNA01004作用研究及更详细的调节机制还有待进一步通过体内试验进行验证。

综上所述,LncRNA01004可能通过上调CPSF1蛋白表达,促进EMT过程,进而促进肿瘤细胞增殖、侵袭,抑制细胞凋亡,参与乳腺癌的发生发展。

#### 参考文献:

- [1] ROY M, FOWLER A M, ULANER G A, et al. Molecular classification of breast cancer[J]. PET Clinics, 2023, 18(4): 441-458.
- [2] MICHAELS E, WORTHINGTON R O, RUSIECKI J. Breast cancer: risk assessment, screening, and primary prevention[J]. the Medical Clinics of North America, 2023, 107(2): 271-284.
- [3] NOLAN E, LINDEMAN G J, VISVADER J E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic[J]. Cell, 2023, 186(8): 1708-1728.
- [4] LONG Feng, ZHOU Xuan, ZHANG Jinhua, et al. The role of lncRNA HCG18 in human diseases[J]. Cell Biochemistry and Function, 2024, 42(2): e3961.
- [5] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. Molecular Cell, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [6] 刘霄, 黄晓燕, 王建华. 长链非编码 RNA SNHG9 在不同肿瘤中的最新研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(4): 176-180.  
LIU Xiao, HUANG Xiaoyan, WANG Jianhua. Research progress of long non-coding RNA SNHG9 in different tumors[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(4): 176-180.
- [7] MALAKOTI F, TARGHAZEH N, KARIMZADEH H, et al. Multiple function of lncRNA MALAT1 in cancer occurrence and progression[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2023, 101(5): 1113-1137.
- [8] LI Jingxuan, WANG Jiying, WANG Yanping, et al. E2F1 combined with LINC01004 super-enhancer to promote hepatocellular carcinoma cell proliferation and metastasis[J]. Clinical Epigenetics, 2023, 15(1): 17.
- [9] ZHAO Fen, TIAN Hui, WANG Yungang, et al. LINC01004-SPI1 axis-activated SIGLEC9 in tumor-associated macrophages induces radioresistance and the formation of immunosuppressive tumor microenvironment in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2023, 72(6): 1835-1851.
- [10] QIU Peng, BI Jiancheng, LIU Jia, et al. Long non-coding RNA LINC01004 promotes malignant behaviors of pituitary adenoma via miR-323a-3p/136-5p/RCN2 axis[J]. Pathology Research and Practice, 2022, 234: 153884.
- [11] REN Fanggang, ZHANG Na, ZHANG Lan, et al. Alternative polyadenylation: a new frontier in post transcriptional regulation[J]. Biomarker Research, 2020, 8(1): 67.
- [12] XIA Lei, HAN Qing, DUAN Xuehui, et al. M6A-induced repression of SIAH1 facilitates alternative splicing of androgen receptor variant 7 by regulating CPSF1 [J]. Molecular Therapy- Nucleic Acids, 2022, 28: 219-230.
- [13] CHEN Shilu, ZHU Zhongxu, YANG Xia, et al. Cleavage and polyadenylation specific factor 1 promotes tumor progression via alternative polyadenylation and splicing in hepatocellular carcinoma [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 616835.
- [14] KANG Weibiao, YANG Yang, CHEN Changyu, et al. CPSF1 positively regulates NSDHL by alternative polyadenylation and promotes gastric cancer progression[J]. American Journal of Cancer Research, 2022, 12(10): 4566-4583.
- [15] GUO Qianying, WANG Hao, DUAN Jiahao, et al. An alternatively spliced p62 isoform confers resistance to chemotherapy in breast cancer[J]. Cancer Research, 2022, 82(21): 4001-4015.
- [16] WEKKING D, PORCU M, DE SILVA P, et al. Breast MRI: clinical indications, recommendations, and future applications in breast cancer diagnosis[J]. Current Oncology Reports, 2023, 25(4): 257-267.
- [17] AHMADPOUR S T, ORRE C, BERTEVELLO P S, et al. Breast cancer chemoresistance: insights into the regulatory role of lncRNA[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(21): 15897.
- [18] YIP C W, SIVARAMAN D M, PRABHU A V, et al. Functional annotation of lncRNA in high-throughput screening[J]. Essays in Biochemistry, 2021, 65(4): 761-773.
- [19] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. Journal of Cell Biology, 2021, 220(2): e202009045.
- [20] TAN Yuetao, LIN Jinfei, LI Ting, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J]. Cancer Communications (London, England), 2021, 41(2): 109-120.



- world and its relationship with national levels of human development index [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2021, 29(2): 302-306.
- [11] MOREAU P, SAN MIGUEL J, SONNEVELD P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Annals of Oncology*, 2017, 28(suppl\_4): iv52-iv61.
- [12] GALLI M, CHATTERJEE M, GRASSO M, et al. Phase I study of the heparanase inhibitor roneparstat: an innovative approach for multiple myeloma therapy[J]. *Haematologica*, 2018, 103(10): e469-e472.
- [13] BABION I, SNOEK B C, NOVIANTI P W, et al. Triage of high-risk HPV-positive women in population-based screening by miRNA expression analysis in cervical scrapes; a feasibility study [J]. *Clinical Epigenetics*, 2018, 10: 76.
- [14] 周瑜辉, 张伟, 孙静岚, 等. miR-455-5p 在乳腺癌组织中表达及对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2021, 35(4): 340-344. ZHOU Yuhui, ZHANG Wei, SUN Jinglan, et al. Expression of miR-455-5p in breast cancer and its influence on the proliferation and invasion of MCF-7 cells [J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2021, 35(4): 340-344.
- [15] HANDA H, MURAKAMI Y, ISHIHARA R, et al. The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1738.
- [16] 黄娟娟, 卓芬, 蔡月红, 等. 血清 miR-424 及 miR-765 在多发性骨髓瘤中的表达及其临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30(2): 461-465. HUANG Juanjuan, ZHUO Fen, CAI Yuehong, et al. Expression and clinical significance of serum miR-424 and miR-765 in multiple myeloma [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2022, 30(2): 461-465.
- [17] 杜娟英, 薛海鲸. 多发性骨髓瘤患者血清微小 RNA-424, 可溶性晚期糖基化终末产物受体、c-kit 受体蛋白检测及临床意义 [J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(12): 1585-1588, 1592. DU Juanying, XUE Haijing. Detection and clinical significance of serum miR-424, sRAGE and CD117 in patients with multiple myeloma [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2022, 51(12): 1585-1588, 1592.
- [18] 苑军伟, 吴静, 林静, 等. LncRNA NORAD 靶向抑制 miR-363-3p 对多发性骨髓瘤细胞生物学行为的影响及机制 [J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1650-1657. YUAN Junwei, WU Jing, LIN Jing, et al. Effects of LncRNA NORAD targeted inhibition of miR-363-3p on biological behavior of multiple myeloma cells and its mechanisms [J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1650-1657.
- [19] 王玉, 李超, 满其航. miR-363-3p 在多发性骨髓瘤中的表达意义及其与预后的关系 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(10): 702-705. WANG Yu, LI Chao, MAN Qihang. Significance of plasma miR-363-3p expression in multiple myeloma and its relationship with prognosis [J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2021, 34(10): 702-705.
- [20] 黄娟娟, 卓芬, 肖华, 等. 血清 miR-424 及 miR-520 在多发性骨髓瘤中的表达及其临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(7): 1268-1272. HUANG Juanjuan, ZHUO Fen, XIAO Hua, et al. Expression and clinical significance of serum miR-424 and miR-520 in multiple myeloma [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2022, 30(7): 1268-1272.
- [21] GOROSHINSKAYA I A, FRANZINTZ E M, ZUDERMAN N E, et al. Indicators of kidney damage in patients with multiple myeloma in the process of chemotherapeutic treatment [J]. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*, 2018, 63(12): 741-749.
- [22] 杨敏. 多发性骨髓瘤患者血清 Cys-C, Urea, Scr 及  $\beta_2$ -MG 水平检测及其临床意义 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(3): 506-510. YANG Min. Detection of levels of serum Cys-C, Urea, Scr and  $\beta_2$ -MG in patients with multiple myeloma and their clinical significance [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2019, 26(3): 506-510.
- 收稿日期: 2024-04-02  
修回日期: 2024-05-15
- (上接第 37 页)
- [21] MAYRO B, HOJ J P, CERDA-SMITH C G, et al. ABL kinases regulate the stabilization of HIF-1  $\alpha$  and MYC through CPSF1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(16): e2210418120.
- [22] SAKAI A, ANDO M, FUKUSUMI T, et al. Aberrant expression of CPSF1 promotes head and neck squamous cell carcinoma via regulating alternative splicing[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233380.
- [23] MANFIOLETTI G, FEDELE M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11386.
- [24] 陈恩, 李忠辉, 王颖. miR-198 通过靶向 ZEB2 调控 EMT 过程抑制肝癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 23-29. CHEN Cai, LI Zhonghui, WANG Ying. Study on the mechanism of miR-198 inhibiting the proliferation and migration of hepatoma cells by regulating EMT process by targeting ZEB2[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 23-29.
- [25] MORTEZAEE K, MAJIDPOOR J, KHARAZINEJAD E. Epithelial-mesenchymal transition in cancer stemness and heterogeneity: updated[J]. *Medical Oncology*, 2022, 39(12): 193.
- [26] SEO J, HA J, KANG E, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition-regulating transcription factors in anti-cancer drug resistance[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2021, 44(3): 281-292.
- [27] MCCABE E M, RASMUSSEN T P. LncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2021, 75: 38-48.
- 收稿日期: 2024-04-08  
修回日期: 2024-07-03