

LncCCAT1 竞争性结合 miR-583p 通过调节 MAPK13 的表达调控乳腺癌细胞干细胞样特性

庄欢 朱晓磊 吴晓琴 张庆方 靖 吴池华

摘要 目的 探究 LncCCAT1 竞争性结合 miR-583p 通过调节 MAPK13 的表达对 MCF-7 细胞干细胞样特性的影响。方法 从 MCF-7 细胞中分离乳腺癌肿瘤干细胞, q-PCR 检测贴壁细胞、悬浮球细胞和再贴壁细胞中 CCAT1 和 miR-583p 表达;单独或联合转染 shRNA-CCAT1-2 和 miR-583p inhibitor 至 MCF-7 细胞,测 miR-583p 表达;荧光素酶报告实验验证 miR-583p 与 CCAT1 靶向关系;将细胞分为 4 组:对照组、shRNA-CCAT1-2 组、miR-583p inhibitor 组、shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor 组。ALDEFLUOR 分析法检测乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性;Western blot 检测 Y 框蛋白 2 (SOX2)、NANOG、乙醛脱氢酶 1 (ALDH1) 蛋白表达水平;成球实验检测细胞成球直径;构建慢病毒 LV-MAPK13 并感染 MCF-7 细胞过表达 MAPK13, q-PCR 检测 MAPK13 水平,将细胞分为 4 组:对照、shRNA-CCAT1-2、LV-MAPK13 和 shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 组,Western blot 检测丝裂原活化蛋白激酶 13 (MAPK13)、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达水平。结果 与贴壁细胞相比较,悬浮球细胞 CCAT1 表达水平升高 ($P < 0.05$), miR-583p 表达水平降低 ($P < 0.05$); miR-583p 和 CCAT1 存在直接靶向作用关系;与对照组相比较,shRNA-CCAT1-2 组 ALDH 活性降低, SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), 成球直径降低 ($P < 0.05$)。miR-583p inhibitor 组 ALDH 活性升高, SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 成球直径升高 ($P < 0.05$)。与 miR-583p inhibitor 组相比较, shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor 组 ALDH 活性降低, SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), 成球直径降低 ($P < 0.05$); miR-583p 与 MAPK13 存在直接靶向作用关系。与贴壁细胞相比较,悬浮球细胞 MAPK13 水平升高 ($P < 0.01$)。与对照组相比较, LV-MAPK13 组 MAPK13 水平升高 ($P < 0.001$); 与对照组相比较, shRNA-CCAT1-2 组 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), LV-MAPK13 组 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。与 LV-MAPK13 组相比较, shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 组 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。结论

LncCCAT1 竞争性结合 miR-583p 通过调节 MAPK13 的表达抑制 MCF-7 细胞干细胞样特性。

关键词 乳腺癌; CCAT1; miR-583p; MAPK13; 干细胞样特性
中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0762-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.017

乳腺癌是全世界女性与癌症相关的死亡的主要原因,全世界每年有将近 140 万妇女被诊断出患有这种疾病,每年超过 45 万例死亡^[1]。乳腺癌最常用的治疗方法是手术切除肿瘤,辅以辅助化疗或放疗^[2]。尽管在乳腺癌的早期检测和治疗方面取得了进步,但乳腺癌的发病率和死亡率仍逐年上升,迫切需要发现乳腺癌的诊断和治疗新靶标用于治疗乳腺癌。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子非编码调控 RNA,在乳腺癌中起癌基因或抑癌作用^[3]。结肠癌相关转录因子 1 (colon cancer associated transcript 1, CCAT1) 是 2012 年在结肠癌中发现的一种新型 LncRNA,被证实在乳腺癌中高表达,与乳腺癌组织分化程度、TNM 分期和淋巴结转移相关^[4]。相关研究^[5]表明丝裂原活化蛋白激酶 13 (MAPK13) 在妇科肿瘤干细胞中高表达,对于维持肿瘤干细胞致癌能力有一定的作用。但 CCAT1 与 MAPK13 对乳腺癌发生发展的分子机制尚不清楚。该文旨在探究 LncCCAT1 竞争性结合 miR-583p 通过调节 MAPK13 的表达对 MCF-7 细胞干性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 RPMI 1640 培养基 (批号: 61870-127)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号: 26400-036)、青-链霉素 (批号: 15140-122)、胰蛋白酶 (批号: 25200-056)、F12 培养基 (批号: 21700-075) 购自美国 Gibco 公司;牛血清白蛋白 (Bovine albumin, BSA, 批号: ST025)、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS, 批号: C0221A)、LipoRNAiTM 转染试剂 (批号: C0535)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0012) 购自上海碧云天生物技术研究; 荧

2020-11-30 接收

基金项目: 四川省科技计划项目 (编号: 18ZDYF1090)

作者单位: 四川省医学科学院·四川省人民医院乳腺科, 成都 610031

作者简介: 庄欢, 女, 本科;

朱晓磊, 女, 本科, 责任作者, E-mail: zhuxiaoleizh@163.com

光素酶(批号:L7840)检测试剂盒购自北京 solarbio 公司; Anti MAPK13(货号: ab236738)、SOX2(货号: ab97959)、NANOG(货号: ab80892)、ALDH1(货号: ab87117)、GAPDH(货号: ab9485)购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞处理 人乳腺癌细胞 MCF-7 来源于美国典型培养物保藏中心,用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。参照胡楠等^[6]方法分离乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs),用 PBS 洗去血清,悬浮培养于无 FBS 的含 5 mg/L 胰岛素,10 µg/L 重组人碱性成纤维细胞生长因子,20 µg/L 表皮细胞生长因子,0.04% BSA 的无酚红 DMED-F12 培养基中。传代时每次 1×10^4 个细胞接种于 25 cm³ 培养瓶中,用低速离心机分离微球,胰酶消化,离心除去胰酶,重悬于无血清培养基中。微球直径长至 80 µm 之前传代,每 5 d 传代 1 次。

1.3 q-PCR 法 使用 TRIzol 试剂按照试剂说明书从 MCF-7 细胞中分离总 RNA,然后用 BeyoRTTM cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA,用 BeyoFastTM SYBR Green qPCR Mix 在 PCR 仪上进行测定,用 2^{-ΔΔCt} 方法计算。检测贴壁细胞、悬浮球细胞和再贴壁细胞中 CCAT1 和 miR-583p 表达水平。

1.4 细胞分组 为了防止脱靶效应,设计了 3 对 shRNA 序列干扰 CCAT1 的表达,通过 q-PCR 检测选择效果最好的 sh-CCAT1-2 进行后续试验。用 miR-583p mimic 或 miR-583p inhibitor 转染 MCF-7 细胞以过表达或低表达 miR-583p, q-PCR 检测 miR-583p 表达水平。取对数生长期的 MCF-7 细胞,构建 shRNA CCAT1 载体,采用 LipoRNAiTM 转染试剂将 sh-CCAT1 和 miR-583p inhibitor 单独或联合转染 MCF-7 细胞,将细胞随机分为 4 组:对照、shRNA-CCAT1-2、miR-583p inhibitor 和 shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor 组。

1.5 荧光素酶报告实验 为了检测 CCAT1 是否为 miR-583p 的直接下游靶基因,选用荧光素酶报告分析。通过 miRDB 预测 LncCCAT1 和 miR-583p 的靶向关系,构建野生型和突变型 CCAT1 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒。按照荧光素酶检测试剂盒进行检测。

1.6 ALDEFLUOR 分析 采用 ALDEFLUOR 分析方法对乳腺癌细胞 MCF-7 ALDH 活性进行分析,根据 ALDEFLUOR 试剂盒说明书进行检测:40 µm 滤器收集细胞球,胰酶消化 8 min,反复吹打 10 次悬浮

于含 5 µl 的 ALDH 底物 BodipyTM-aminoacetaldehyde 中,37 °C 孵育 40 min。将等分试样加入 5 µl 处理过的 ALDH 抑制剂 DEAB,重悬于孵育缓冲液中,用流式细胞仪进行检测。

1.7 成球实验 将各组细胞经流式细胞仪计数后铺至超低黏附 96 孔板。每孔 100 µl F12 成球培养基,含 10 个活细胞,各铺 10 个复孔。静置培养 14 d 后倒置显微镜下观察成球直径。

1.8 Western blot 取对数生长期的各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取,用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。提取等量的蛋白质样品,100 °C 变性 5 min,SDS-PAGE 凝胶电泳法分离并转移至 PVDF 膜,4 °C 条件下加入相应一抗并孵育过夜,4 °C 下加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h,最后加入发光液,曝光处理。ImageJ 软件统计灰度值。

1.9 MAPK13 过表达对 MCF-7 细胞的影响 通过 miRDB 预测 MAPK13 和 miR-583p 的靶向关系,构建慢病毒 LV-MAPK13 并转染 MCF-7 细胞过表达 MAPK13, q-PCR 检测 MAPK13 水平。采用 LipoRNAiTM 转染试剂将 shRNA-CCAT1-2 和 LV-MAPK13 单独或联合转染 MCF-7 细胞,将细胞随机分为 4 组:对照、shRNA-CCAT1-2、LV-MAPK13 和 shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 组,shRNA-CCAT1-2 组转染 shRNA-CCAT1-2, LV-MAPK13 组细胞转染 LV-MAPK13, shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 组细胞同时转染 shRNA-CCAT1-2 和 LV-MAPK13。Western blot 检测 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达水平。

1.10 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间进行比较采用方差分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncCCAT1 和 miR-583p 表达水平 通过 q-PCR 检测 CCAT1 和 miR-583p 表达水平结果如图 1 所示,与贴壁细胞相比较,悬浮球细胞 CCAT1 表达水平升高($t = 1.741, P < 0.05$),miR-583p 表达水平降低($t = 1.564, P < 0.05$)。

2.2 miR-583p 和 CCAT1 靶向关系 通过 q-PCR 检测 3 个 CCAT1 shRNA 中 CCAT1 水平结果如图 2B 所示,与对照组相比,shRNA-CCAT1-1、shRNA-CCAT1-3 组 CCAT1 水平降低($F = 59.15, P <$

0.05) ,shRNA-CCAT1-2 组 CCAT1 水平降低 ($t = 1.381$, $P < 0.01$) ,选择 shRNA-CCAT1-2 进行后续实验;分别用 miR-583p mimic 或 miR-583p inhibitor 转染 MCF-7 细胞以过表达或低表达 miR-583p ,q-PCR 检测 miR-583p 表达水平结果如图 2C、D 所示 ,与对照组相比 ,miR-583p mimic 组 miR-583p 表达水平升高 ($t = 1.049$, $P < 0.001$) ,miR-583p inhibitor 组 miR-583p 表达水平升高 ($t = 1.299$, $P < 0.01$) ;通过 shRNA-CCAT1-2 和 miR-583p inhibitor 单独或联合转染 MCF-7 细胞 ,q-PCR 法检测 miR-583p 的表达情况结果如图 2E 所示 ,与对照组相比 ,shRNA-CCAT1-2 组 miR-583p 表达水平升高 ($t = 1.709$, $P < 0.01$) ,miR-583p inhibitor 组 miR-583p 表达水平降低 ($t = 1.299$, $P < 0.01$) 。与 miR-583p inhibitor 组相比较 ,shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor 组 miR-583p 表达水平升高 ($t = 1.325$, $P < 0.01$) 。为明确 miR-583p 对 CCAT1 的靶向关系 ,采用荧光素酶实验检测 ,搜索 NCBI 数据库获得 CCAT1 3'UTR 序列如图 2A 所示 ,CCAT1 WT 加入 miR-583p mimic 处理后荧光素酶活性降低 ($t = 2.441$, $P < 0.01$,图 2F) 结果证明 miR-583p 和 CCAT1 存在直接靶向作

用关系。

2.3 LncCCAT1 竞争性结合 miR-583p 降低 MCF-7 细胞 ALDH 活性及 SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达水平 通过 ALDEFLUOR 分析检测干细胞和祖细胞的酶标记物乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase ,ALDH) 活性结果如图 3A 所示 ,对照组 ALDH 活性高于 shRNA-CCAT1-2 组 ,低于 miR-583p inhibitor 组。shRNA-CCAT1-2 + miR-583p

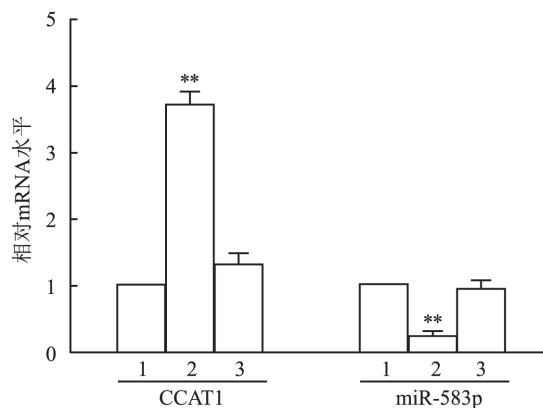


图1 LncCCAT1 和 miR-583p 表达水平

1: 贴壁细胞; 2: 悬浮球细胞; 3: 再贴壁细胞; 与贴壁细胞比较:

** $P < 0.05$

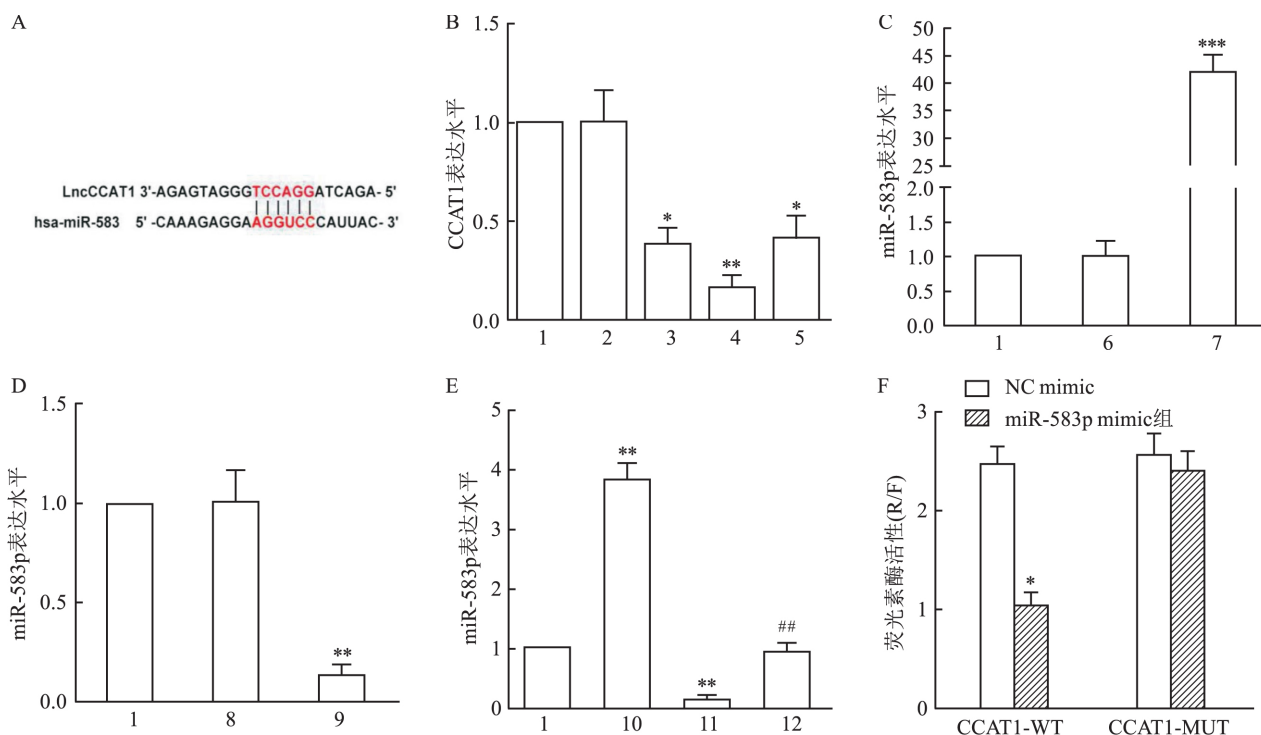


图2 miR-583p 和 CCAT1 靶向关系

A: miR-583p 与 CCAT1 靶向关系; B: 3 个 CCAT1 shRNA 中 CCAT1 水平; C: 过表达 miR-583p 后 miR-583p 表达水平; D: 低表达 miR-583p 后 miR-583p 表达水平; E: sh-CCAT1 和 miR-583p inhibitor 单独或联合转染后 miR-583p 表达水平; F: 荧光素酶报告实验验证 miR-583p 与 CCAT1 靶向关系; 1: 对照组; 2: shRNA-NC 组; 3: shRNA-CCAT1-1 组; 4: shRNA-CCAT1-2 组; 5: shRNA-CCAT1-3 组; 6: NC mimic 组; 7: miR-583p mimic 组; 8: NC inhibitor 组; 9: miR-583p inhibitor 组; 10: shRNA-CCAT1-2 组; 11: miR-583p inhibitor 组; 12: shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 miR-583p inhibitor 组比较: ## $P < 0.01$

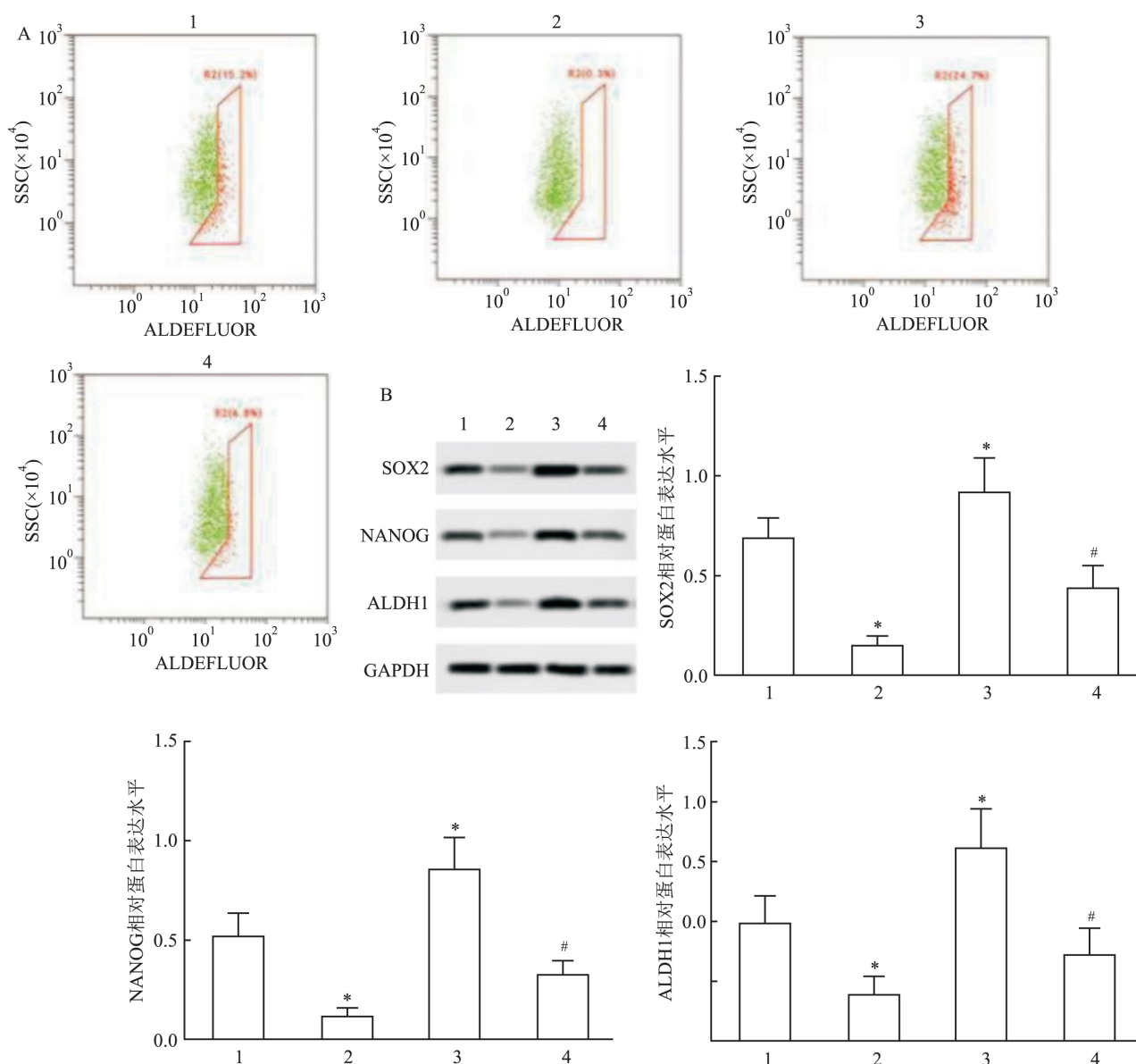


图3 LncCCAT1竞争性结合miR-583p对MCF-7细胞ALDH活性及SOX2、NANOG、ALDH1蛋白表达水平的影响

A: ALDEFLUOR分析检测ALDH活性; B: SOX2、NANOG、ALDH1蛋白表达; 1: 对照组; 2: shRNA-CCAT1-2组; 3: miR-583p inhibitor组; 4: shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与miR-583p inhibitor组比较: # $P < 0.05$

inhibitor组ALDH活性低于miR-583p inhibitor组;通过Western blot检测各组细胞SOX2、NANOG、ALDH1蛋白表达水平结果如图3B所示,与对照组相比,shRNA-CCAT1-2组SOX2、NANOG、ALDH1蛋白水平降低($t = 1.519, 1.550, 2.250, P < 0.05$),miR-583p inhibitor组SOX2、NANOG、ALDH1蛋白水平升高($t = 6.913, 4.000, 4.120, P < 0.05$)。与miR-583p inhibitor组相比,shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor组SOX2、NANOG、ALDH1蛋白水平降低($t = 2.792, 2.208, 2.556, P < 0.05$)。

2.4 LncCCAT1竞争性结合miR-583p降低MCF-7细胞成球直径

通过成球实验检测各组细

胞成球直径结果如图4所示,与对照组相比,shRNA-CCAT1-2组成球直径降低($t = 1.933, P < 0.05$),miR-583p inhibitor组成球直径升高($t = 4.882, P < 0.05$)。与miR-583p inhibitor组相比,shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor组成球直径降低($t = 2.774, P < 0.05$)。

2.5 MAPK13过表达对MCF-7细胞的影响 为明确miR-583p对MAPK13的靶向关系,搜索NCBI数据库获得MAPK13 3'UTR序列如图5A所示,采用荧光素酶实验检测,MAPK13 wt加入miR-583p mimic处理后荧光素酶活性降低($t = 1.889, P < 0.01$,图5B),表明miR-583p与MAPK13存在直接

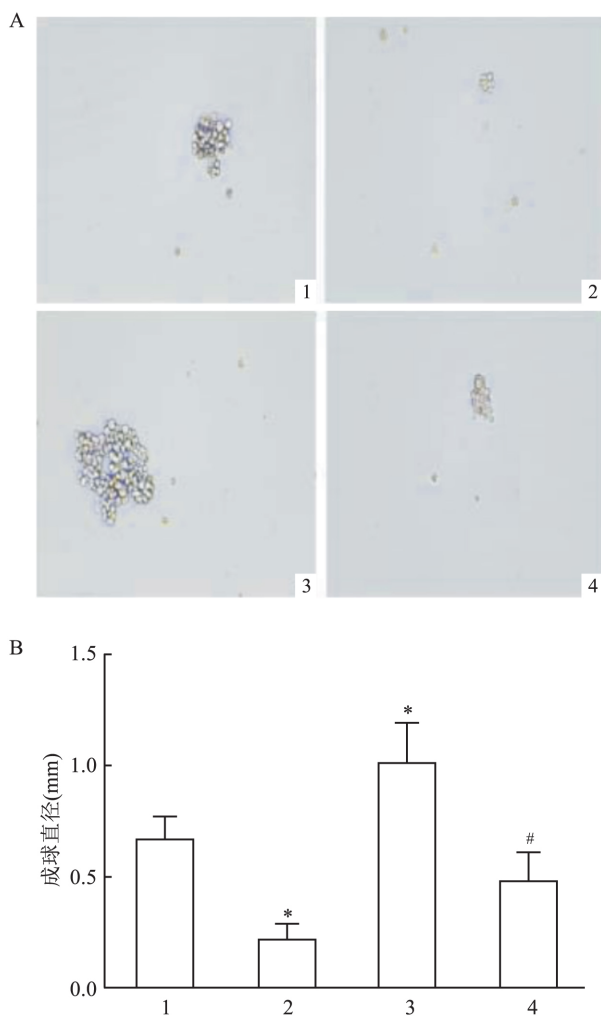


图4 LncCCAT1竞争性结合miR-583p对MCF-7

细胞成球直径的影响

A: 细胞成球实验检测细胞成球直径; B: 细胞成球直径直方图;

1: 对照组; 2: shRNA-CCAT1-2组; 3: miR-583p inhibitor组; 4: shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-583p inhibitor组比较: # $P < 0.05$

靶向作用关系; 构建慢病毒 LV-MAPK13 并转染 MCF-7 细胞过表达 MAPK13, q-PCR 检测各组细胞 MAPK13 水平结果图 5C、D 所示, 与贴壁细胞相比, 悬浮球细胞 MAPK13 水平升高 ($t = 2.053$, $P < 0.01$)。与对照组相比, LV-MAPK13 组 MAPK13 水平升高 ($t = 1.604$, $P < 0.001$); 通过 Western blot 检测各组细胞 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达水平结果如图 5E 所示, 与对照组相比, shRNA-CCAT1-2 组 LV-MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($t = 1.550$ 、 1.519 、 1.550 、 2.250 , $P < 0.05$)。LV-MAPK13 组 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平升高 ($t = 1.391$ 、 1.889 、 1.911 、 1.375 , $P < 0.05$)。与 LV-MAPK13 组相比, sh-CCAT1 +

MAPK13 组 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白水平降低 ($t = 1.237$ 、 1.570 、 1.587 、 1.225 , $P < 0.05$)。

3 讨论

长链非编码 RNA 是一类长度超过 200 个核苷酸序列的非编码 RNA, 其异常表达与多种恶性肿瘤的生物学行为密切相关, 如细胞增殖、侵袭和自噬等。Han et al^[7] 发现 CCAT1 在三阴性乳腺癌肿瘤组织及细胞系中高表达, 促进三阴性乳腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移。LncRNA 和 miRNA 间存在着紧密的调控关系, LncRNA 可作为一种竞争性内源 RNA 与 miRNA 相互作用, 参与靶基因的表达调控, 已被证实发生在乳腺癌的发生、维持、转移及耐药中起重要作用^[8]。Lai et al^[9] 表明 CCAT1 下调通过负向调控 miR-148b 表达, 减少癌细胞集落形成率, 促进细胞凋亡, 从而提高乳腺癌细胞的放射敏感性。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中具有自我更新能力的细胞, 其可分化成为不同家族的肿瘤细胞构成整个肿瘤。肿瘤细胞获得干细胞表型后具有较强的成球能力, 并分化成其他类型的肿瘤细胞。肿瘤干细胞表型的获得是恶性肿瘤重要的生物学特性, 也是肿瘤复发的重要因素之一^[10]。靶向肿瘤干细胞是治疗癌症的有效途径之一。本文表明, 沉默 CCAT1 表达降低 MCF-7 细胞成球直径, 抑制 miR-583p 表达则升高 MCF-7 细胞成球直径, 并且减弱 sh-CCAT1 对 MCF-7 细胞成球直径的抑制作用, 表明 CCAT1 能升高 MCF-7 细胞成球直径, 并且其作用机制与其下调 miR-583p 表达有关。

P388 MAPK 也称为 MAPK13, 是脂肪细胞分化的主要候选基因。p38 蛋白激酶是 MAPK 通路中控制炎症反应最重要的一条, 通过介导癌细胞黏着、增强乳腺癌细胞运动性等机制, 促进乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移^[11]。SOX2 是 SOX 基因家族的一员, 是癌症干细胞标志物, 在维持干细胞多能性方面起着重要作用, 参与肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移、耐药、复发等过程^[12]。Wang et al^[13] 表明 SOX2 在乳腺癌组织中高表达。NANOG 是含同源结构域的转录因子, 在胚胎干细胞干性维持和自我更新中起作用, 在干细胞中表达, 在分化成熟细胞中表达缺失, 可促进肿瘤的转移, 相关研究^[14] 表明 NANOG 在乳腺癌组织中表达升高。ALDH1 属于细胞内乙醛氧化脱氢酶, 是干细胞生长、分化的必需物质, 可作为肿瘤干细胞的标记物。研究表明乳腺癌细胞 ALDH1 表达上调, 则其增殖分化能力、集落形成能

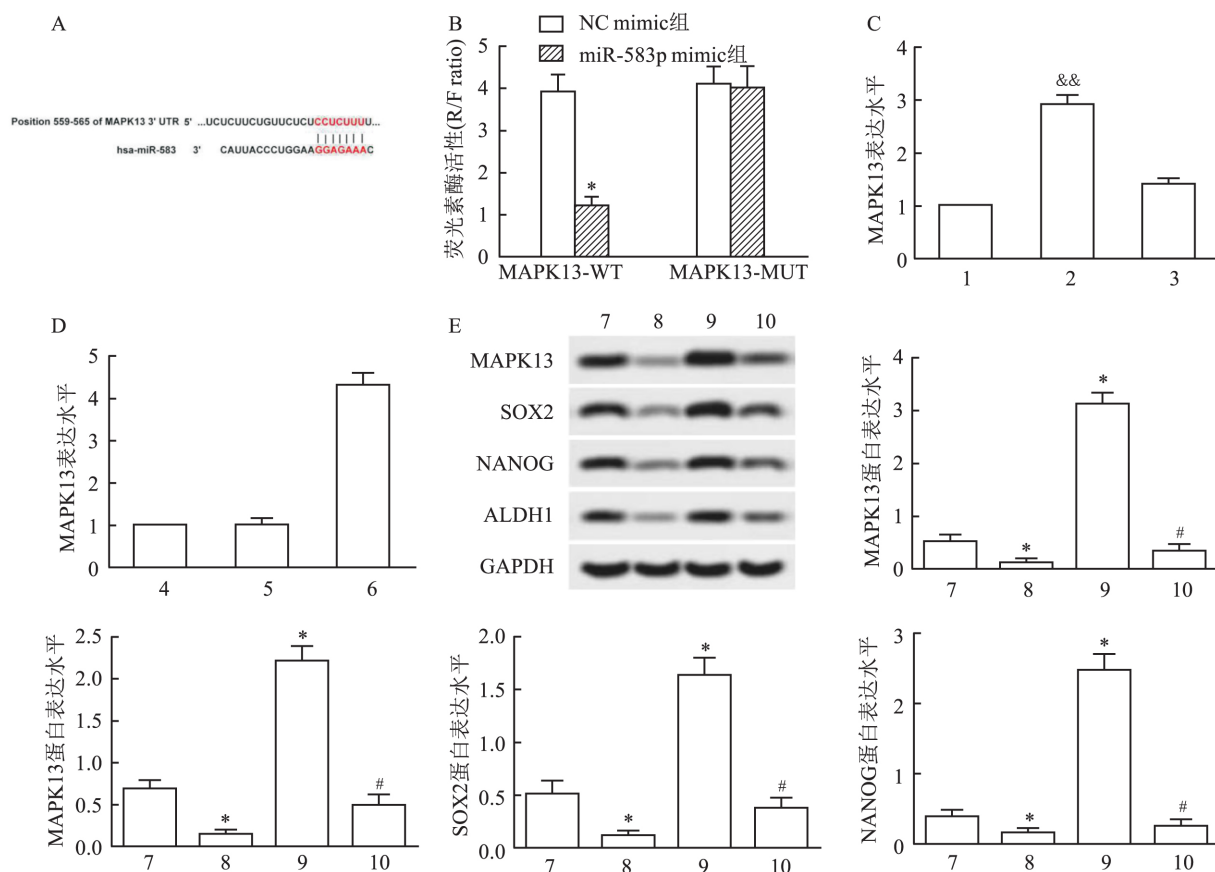


图5 MAPK13 过表达对 MCF-7 细胞的影响

A: miR-583p 与 MAPK13 靶向关系; B: 荧光素酶报告实验验证 miR-583p 与 MAPK13 靶向关系; C: MAPK13 水平; D: 过表达 MAPK13 后 MAPK13 水平; E: MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达; 1: 贴壁细胞; 2: 悬浮球细胞; 3: 再贴壁细胞; 4: 对照组; 5: LV-NC 组; 6: LV-MAPK13 组; 7: 对照组; 8: shRNA-CCAT1-2 组; 9: LV-MAPK13 组; 10: shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 组; 与贴壁细胞比较: $^{&&}P < 0.05$; 与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与 LV-MAPK13 组比较: $^{\#}P < 0.05$

力、黏附能力、迁移能力和侵袭能力都会不同程度的增强^[15]。本文显示沉默 CCAT1 的表达可抑制 MAPK13、SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白的表达, miR-583p inhibitor 或 LV-MAPK13 能明显减弱 sh-CCAT1 对细胞 SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达的抑制作用。提示沉默 CCAT1 表达后, CCAT1 对 miR-583p 或 LV-MAPK13 的抑制作用消失, miR-583p 或 MAPK13 的表达抑制 SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白表达, 表明 CCAT1 高表达可通过下调 miR-583p 或 MAPK13 的表达抑制 SOX2、NANOG、ALDH1 蛋白的表达, 从而抑制 MCF-7 细胞干细胞样特性。

参考文献

- [1] Sokolosky M, Chappell W H, Stadelman K, et al. Inhibition of gsk-3 β activity can result in drug and hormonal resistance and alter sensitivity to targeted therapy in mcf-7 breast cancer cells [J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 820-33.
- [2] 张舟, 邓小冲, 章骏等. RNAi 技术敲减乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 SIRT2 基因的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 245-9.
- [3] 徐绍莲, 何晓刚, 张露, 等. microRNA-100 对乳腺癌细胞和乳腺癌细胞增殖能力的负调控作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 177-82.
- [4] Zhang X F, Liu T, Li Y, et al. Overexpression of long non-coding rna ccat1 is a novel biomarker of poor prognosis in patients with breast cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 9440-5.
- [5] Yasuda K, Yoshihiko H, Kuroda T, et al. Mapk13 is preferentially expressed in gynecological cancer stem cells and has a role in the tumor-initiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(4): 643-7.
- [6] 胡楠, 邓力, 包旭, 等. 组蛋白去甲基化酶 jmj3d 对乳腺癌干细胞的影响 [J]. 华西药理学杂志, 2018, 33(5): 485-9.
- [7] Han C Y, Li X B, Fan Q, et al. Ccat1 promotes triple-negative breast cancer progression by suppressing mir-218/zfx signaling [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(14): 4858-75.
- [8] 侯敏, 蒋琳, 詹红梅, 等. 乳腺癌相关 lncrna-mirna-mrna 共表达及关键基因网络构建预测 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(1): 26-33.
- [9] Lai Y, Chen Y, Lin Y H, et al. Down-regulation of lncrna ccat1

- enhances radiosensitivity *via* regulating mir-148b in breast cancer [J]. *Cell Biol Int*, 2018 42(2): 227–36.
- [10] 赵 蔚. 靶向乳腺癌干细胞治疗的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017 38(5): 641–50.
- [11] Paine E, Palmantier R, Akiyama S K, et al. Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (map) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type iv through a p38 map kinase-dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 2000 275(15): 11284–90.
- [12] Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Correlation of cd133, oct4, and sox2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy[J]. *Ann Surg Oncol* 2009 16(12): 3488–98.
- [13] Wang X, Zhao Y N, Xiao Z F, et al. Alternative translation of oct4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response[J]. *Stem Cells*, 2009 27(6): 1265–75.
- [14] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell* 2003 113(5): 643–55.
- [15] 刘丽娟, 孙长岗. Aldh1 与乳腺癌干细胞及其中医药研究进展[J]. 中国老年保健医学, 2013 11(1): 58–61.

LncCCAT1 competitively binds miR-583p to regulate the dryness of breast cancer cells by regulating the expression of MAPK13

Zhuang Huan, Zhu Xiaolei, Wu Xiaoqin, et al

(Dept of Breast, Sichuan Academy of Medical Sciences. Sichuan People's Hospital, Chengdu 610031)

Abstract Objective To explore the effect of the competitive binding of LncCCAT1 to miR-583p on the stem-like characteristics of MCF-7 cells by regulating the expression of MAPK13. **Methods** Breast cancer tumor stem cells were isolated from MCF-7 cells and the expressions of CCAT1 and miR-583p were detected by q-PCR in Adherent cells, suspension Spheres and Re-adherent cells. Expression of miR-583p was measured after transfection of shRNA-CCAT1-2 and miR-583p inhibitor into MCF-7 cells alone or in combination. The luciferase reporting experiment verified the targeting relationship between miR-583p and CCAT1. The cells were divided into four groups: Control, shRNA-CCAT1-2, miR-583p inhibitor and shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor. ALDEFLUOR analysis was used to detect ALDH activity. The expression levels of SOX2, NANOG and ALDH1 were detected by Western blot. The pellet diameter was measured by pellet formation experiment. The lentivirus LV-MAPK13 was constructed and infected with MCF-7 cells to overexpress MAPK13. The MAPK13 level was detected by q-PCR, and the cells were divided into four groups: Control, shRNA-CCAT1-2, LV-MAPK13 and shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 groups. The protein Western blot was used to detect the protein expression levels of MAPK13, SOX2, NANOG and ALDH1. **Results** Results showed that compared with Adherent group, CCAT1 expression levels increased ($P < 0.05$) while miR-583p expression levels decreased ($P < 0.05$) in Spheres group. There was a direct targeting relationship between miR-583p and CCAT1. Compared with the control group, the ALDH activity of shRNA-CCAT1-2 group decreased, the protein levels of SOX2, NANOG and ALDH1 decreased ($P < 0.05$), and the ball diameter decreased ($P < 0.05$). In the miR-583p inhibitor group, ALDH activity increased, SOX2, NANOG, and ALDH1 protein levels increased ($P < 0.05$), and ball diameter increased ($P < 0.05$). Compared with the miR-583p inhibitor group, the ALDH activity, SOX2, NANOG and ALDH1 protein levels and ball diameter of the shRNA-CCAT1-2 + miR-583p inhibitor group decreased ($P < 0.05$). There was a direct targeting relationship between miR-583p and MAPK13. Compared with Adherent group, MAPK13 levels of Spheres group increased ($P < 0.01$). Compared with Control group, MAPK13 level of LV-MAPK13 group increased ($P < 0.001$). Compared with the control group, MAPK13, SOX2, NANOG, and ALDH1 protein levels in shRNA-CCAT1-2 group decreased ($P < 0.05$), while those in LV-MAPK13 group increased ($P < 0.05$). Compared with LV-MAPK13 group, the protein levels of MAPK13, SOX2, NANOG and ALDH1 in shRNA-CCAT1-2 + LV-MAPK13 group decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** LncCCAT1 competitively binds to miR-583p to inhibit the stem cell like characteristics of MCF-7 cells by regulating the expression of MAPK13.

Key words breast cancer; CCAT1; miR-583p; MAPK13; stem cell-like characteristics