

蒲公英多糖通过下调 LncRNA CCAT1 表达抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭

刘晓燕^{1,2}, 龙凤^{1,3,4*}, 黄勇^{1,4}, 赵玉¹, 周旋¹, 潘靖宇¹, 李雪¹, 叶海琳¹

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 西安宝石花长庆医院, 陕西 西安 710000

3. 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室, 甘肃 兰州 730000

4. 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 通过观察蒲公英多糖 (dandelion polysaccharide, DP) 联合小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 靶向沉默长链非编码 RNA (LncRNA) 结肠癌相关转录因子 1 (colon cancer-associated transcript 1, CCAT1) 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响, 探究 DP 抗乳腺癌可能的分子机制。 **方法** 在线数据工具分析 CCAT1 在乳腺癌组织中的差异表达, qRT-PCR 分别检测 CCAT1 在乳腺癌细胞系中的差异表达、DP (100、200 $\mu\text{g/mL}$) 对 MCF-10A、MCF-7、MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 表达的影响以及 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 表达的影响; CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验分别检测 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞活力、迁移和侵袭能力的影响; 在线数据工具预测 CCAT1 下游靶基因及靶基因富集的信号通路; Western blotting 检测 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞 EMT 相关蛋白及蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)/细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)/周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinases 6, CDK6) 信号通路中关键蛋白表达的影响。 **结果** 与癌旁正常组织及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 相比, CCAT1 在人乳腺癌组织和细胞中高表达 ($P < 0.01$); 与对照组比较, DP 呈剂量和时间相关性地抑制 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞活力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但对 MCF-10A 细胞活力无明显影响; 与 MCF-10A 及 MCF-7 细胞相比, DP 可显著下调 MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 表达水平 ($P < 0.01$); 与 siNC 组比较, siRNA 可显著降低 CCAT1 在 MDA-MB-231 细胞中的表达 ($P < 0.01$), 且 DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 联合 siCCAT1 更加显著降低了 MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 的表达水平 ($P < 0.01$); 与对照组及 siNC 组比较, DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 和 siCCAT1 均能抑制 MDA-MB-231 细胞活力 ($P < 0.01$), 且 DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞活力的抑制作用更为明显 ($P < 0.01$); 与对照组及 siNC 组比较, DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 和 siCCAT1 均能抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.01$), 且 DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 联合 siCCAT1 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的作用更为明显 ($P < 0.01$); 与单独用 DP 或 siCCAT1 相比, DP 联合 siCCAT1 处理 MDA-MB-231 细胞中 EMT 进程相关蛋白 E-cadherin 表达上调更为显著 ($P < 0.01$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达下调更为显著 ($P < 0.01$); 在线生物工具预测出 CCAT1 靶基因共 1 929 个, 这些靶基因主要富集在 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、信号转导、转录调控等关键生物过程; 富集的通路主要有癌症、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 信号通路; 与对照组及 siNC 组比较, DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 和 siCCAT1 均能下调 MDA-MB-231 细胞中 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路关键蛋白 p-PI3K、p-Akt、p-GSK-3 β 、Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且 DP (200 $\mu\text{g/mL}$) 联合 siCCAT1 应用时对其关键蛋白下调作用更为显著 ($P < 0.01$)。 **结论** DP 联合 siCCAT1 显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程, 其机制可能与下调 MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 表达进而抑制 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路有关。

关键词: 蒲公英多糖; 乳腺癌; 结肠癌相关转录因子 1; 蛋白激酶 B/糖原合成激酶-3 β /细胞周期蛋白 D1/周期蛋白依赖性激酶 6 信号通路; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)04-1145-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.009

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 甘肃省“双一流”科研重点项目 (GSSYLXM-05); 教育揭榜挂帅项目 (2021jyjbgs-03); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题 (DHYX22-10)

作者简介: 刘晓燕, 住院医师, 硕士研究生, 从事中药抗肿瘤分子机制研究。E-mail: 1592002457@qq.com

*通信作者: 龙凤, 硕士生导师, 从事中药抗肿瘤分子机制研究。E-mail: nicole.8808@163.com

Dandelion polysaccharide inhibits proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells by down-regulation of LncRNA CCAT1 expression

LIU Xiaoyan^{1, 2}, LONG Feng^{1, 3, 4}, HUANG Yong^{1, 4}, ZHAO Yu¹, ZHOU Xuan¹, PAN Jingyu¹, LI Xue¹, YE Hailin¹

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gem Flower Xi'an Changqing Staff Hospital, Xi'an 710000, China

3. Gansu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases, Lanzhou 730000, China

4. Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Disease and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the possible molecular mechanism of dandelion polysaccharide (DP) against breast cancer by observing the effect of combined siRNA-targeted silencing of long-stranded non-coding RNA colon cancer-associated transcript 1 (CCAT1) on the proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** Online data tools were used to analyze the differential expression of CCAT1 in breast cancer tissues. qRT-PCR was used to detect the differential expression of CCAT1 in breast cancer cell lines, the effect of DP (200 µg/mL) on the expression of CCAT1 in MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells and the effect of siCCAT1 on CCAT1 expression in MDA-MB-231 cells; CCK-8 assay, scratch assay and Transwell assay were used to detect the effects of DP combined with siCCAT1 on the viability, migration and invasion ability of MDA-MB-231 cells, respectively; Online data tools was used to predict CCAT1 downstream target genes and target gene enrichment signaling pathways; Western blotting was used to detect the effects of DP combined with siCCAT1 on the expression levels of EMT-related proteins and key proteins in protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β)/Cyclin D1/cyclin-dependent kinases 6 (CDK6) signaling pathway in MDA-MB-231 cells. **Results** CCAT1 was highly expressed in human breast cancer tissues and cells compared with normal tissues adjacent to cancer and normal breast epithelial cells MCF-10A ($P < 0.01$); Compared with control group, DP inhibited MDA-MB-231 and MCF-7 cell viability in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$), but had no significant effect on cytosolic MCF-10A cell viability; DP significantly downregulated CCAT1 expression levels in MDA-MB-231 cells compared with MCF-10A and MCF-7 cells ($P < 0.01$); Compared with siNC group, siRNA significantly reduced CCAT1 expression in MDA-MB-231 cells ($P < 0.01$), DP (200 µg/mL) combined with siCCAT1 more significantly reduced the expression level of CCAT1 in MDA-MB-231 cells ($P < 0.01$); Compared with control group and siNC group, both DP (200 µg/mL) and siCCAT1 could inhibit MDA-MB-231 cell viability ($P < 0.01$), and the inhibitory effect of DP (200 µg/mL) combined with siCCAT1 on MDA-MB-231 cell viability was more significant ($P < 0.01$); Compared with control group and siNC group, both DP (200 µg/mL) and siCCAT1 inhibited the migration and invasion of MDA-MB-231 cells ($P < 0.01$), DP (200 µg/mL) combined with siCCAT1 inhibited the migration and invasion ability of MDA-MB-231 cells more significantly ($P < 0.01$); EMT process-related protein E-cadherin expression was more significantly upregulated and N-cadherin and Vimentin protein expression were more significantly downregulated in MDA-MB-231 cells treated with DP combined with siCCAT1 than with DP or siCCAT1 alone ($P < 0.01$); Online biological tools predicted a total of 1 929 CCAT1 target genes, which are mainly enriched in RNA polymerase II promoter transcriptional regulation, signal transduction, transcriptional regulation and other key biological processes; Enriched pathways were mainly involved cancer, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway; Compared with control group and siNC group, both DP (200 µg/mL) and siCCAT1 down-regulated the expression levels of p-PI3K, p-Akt, p-GSK-3β, Cyclin D1 and CDK6 proteins in MDA-MB-231 cells ($P < 0.05, 0.01$), which were key proteins of the Akt/GSK-3β/Cyclin D1/CDK6 signaling pathway, DP (200 µg/mL) combined with siCCAT1 application had a more significant effect on the downregulation of above proteins ($P < 0.01$). **Conclusion** DP combined with siCCAT1 significantly inhibited the proliferation, migration, invasion and EMT process of MDA-MB-231 cells, and the mechanism may be related to the downregulation of CCAT1 expression in MDA-MB-231 cells and thus the inhibition of Akt/GSK-3β/Cyclin D1/CDK6 signaling pathway.

Key words: dandelion polysaccharide; breast cancer; colon cancer-associated transcript 1; protein kinase B/glycogen synthase kinase-3β/Cyclin D1/cyclin-dependent kinases 6 signaling pathway; migration; invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。2020 年全球癌症统计数据显示,乳腺癌新发病例约有 226 万例,死亡 68 万例^[1]。近年来,乳腺癌的早期诊断和治疗虽然取得了较大进展,但大多数患者极易复发和转移,特别是三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)患者。TNBC 是一种雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子 2 受体(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)均为阴性的乳腺癌亚型,占有乳腺癌患者的 15%~20%^[2],由于 TNBC 恶性程度高、侵袭性强且缺乏特异性靶向药物,因此,阐明 TNBC 的发病机制、寻找新的治疗靶点和抗癌新药尤为重要^[3]。

中药是抗肿瘤药物的重要来源,因其具有多靶点、多途径的药理活性,显示出相较于其他药物更明显的抗癌优势及广阔的应用前景^[4]。现代临床及药理学研究表明,蒲公英除了具有抗炎、抗氧化等药理活性外,其抗肿瘤作用更为显著^[5]。蒲公英多糖(dandelion polysaccharide, DP)是从蒲公英 *Taraxaci Herba* 根中提取的多糖类成分,由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、葡糖糖醛酸组成^[6],具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、降血糖、提高免疫力的药理活性^[7]。肝癌体内生物模型研究表明,DP 能够降低缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达,并通过抑制磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路的激活抑制肝癌血管生成^[6]。DP 也可通过降低铁转运蛋白和铁负荷的表达抑制肝癌铁代谢,从而抑制肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的生长,同时,经 DP 处理后的荷瘤 Hepa1-6 和 H22 的小鼠肿瘤组织中的铁沉积显著低于阴性对照^[8]。在乳腺癌中,DP 能够通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡实现对人乳腺癌 MCF-7、SK-BR-3 和 T47D 细胞的抑制作用^[9-10]。以上研究表明,DP 不仅可以通过多靶点、多通路形式发挥抗肿瘤药理学活性功能,而且具备不良反应少等优势。但 DP 抗 TNBC 和影响 TNBC 进展的研究甚少,具体机制尚不清楚。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究表明,LncRNA 参与调节肿瘤细胞的发生发展,包括细胞增殖、凋亡、血管生成、迁移、侵袭和耐药性^[11]。LncRNA 结肠癌相关转录因子 1 (colon

cancer-associated transcript 1, CCAT1) 被证实在乳腺癌中过度表达,是乳腺癌进展的潜在预后生物标志物,CCAT1 的下调通过负调控微小 RNA-148b (microRNA-148b, miR-148b) 的表达来改善乳腺癌细胞的放疗敏感性^[12]。CCAT1 还可通过抑制 miR-218/锌指蛋白(zinc finger protein X-linked, ZFX) 信号通路促进 TNBC 细胞增殖、迁移和侵袭^[13]。近年来,以 LncRNA 为靶点的中药有效活性成分抗肿瘤机制的研究日益增多。研究发现,冬凌草甲素联合敲低肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1 (actin filament-associated protein1 antisense RNA 1, AFAP1-AS1) 可抑制人胰腺癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),并在体内抑制裸鼠胰腺癌细胞的成瘤性^[14];在肝癌细胞中,黄芪甲苷通过下调 LncRNA 转化生长因子 β (transforming growth factor β , ATB) 表达而抑制肿瘤细胞的迁移和细胞活力^[15];姜黄素通过上调 LncRNA 母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 表达来抑制吉西他滨耐药的非小细胞肺癌增殖,并诱导细胞凋亡^[16];此外,有研究表明,蒲公英根提取物可以通过靶向下调 LncRNA CCAT1 表达抑制胃癌细胞的增殖和迁移^[17]。然而,DP 联合小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 靶向沉默的 CCAT1 抑制 TNBC 进展的机制研究尚未见报道。

Akt/糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 信号通路是细胞内重要的信号转导途径之一,在多种癌症的发生发展中起着重要作用,如参与肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、EMT 及 DNA 修复等生物过程,该信号通路激活后可进一步激活下游信号因子影响肿瘤进展,如细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinases 6, CDK6) 等^[18]。Cyclin D1 蛋白是最重要的癌蛋白之一,通过与 CDK6 结合形成 Cyclin D1-CDK6 复合物驱动细胞从 G₁ 期向 S 期过渡,从而加速细胞增殖,已有研究证实 Cyclin D1 在肿瘤细胞中的过度表达是由于 *Cyclin D1* 基因的上游信号通路的激活所介导,其上游信号通路包括 PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路^[19]。此外,最近的研究表明,过表达 Cyclin D1、CDK6 也可促进肿瘤的迁移、侵袭和 EMT^[20-23]。因此,寻找能够抑制 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路的天然产物对抑制 TNBC 的发生发展具有重要意义。

本研究通过体外实验,观察 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 进程的影响,分析 CCAT1 参与调控的信号通路,探寻 DP 联合 siCCAT1 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 可能的分子调控机制,从而为以 CCAT1 为靶点研发治疗 TNBC 的靶向药物及药物组合提供实验依据和奠定科学理论基础。

1 材料

1.1 细胞

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 CL-0525),传至 3~4 代;人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 CL-0150),传至 7~8 代;人乳腺癌 MCF-7 细胞株(中国科学院上海细胞库,批号 CL-0149),传至 7~8 代。

1.2 药品与试剂

DP(批号 SP5220,质量分数 $\geq 90\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;MCF-10A 细胞专用培养基(批号 CM-0525)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM 高糖培养基(批号 C11995500BT)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(批号 S711-001S)购自南美 Lonsera 公司;青霉素-链霉素混合溶液(批号 J180034)购自美国 HyClone 公司;CCK-8 试剂盒(批号 CKO4)购自日本同仁公司;riboFECT™ CP Buffer (10 $\times$)、riboFECT™ CP Reagent、lncRNA Smart Silencer NC#1、Ribo™ h-CCAT1_Smart Silencer-3、人属 CCAT1 引物(批号分别为 C10502-05、C10511-05、lnc3N0000001-1-5、lnc3211122065326、LQP0002977/8)购自广州市锐博生物科技有限公司;含去 gDNA 的定量反转录试剂盒、TB Green 染料法标准型定量试剂盒(批号分别为 TKR-RR047A、TKR-RR820A)购自日本 Takara 公司;兔抗人 Vimentin 多克隆抗体、兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体(批号分别为 YT4879、YT1454)购自 ImmunoWay Biotechnology Company;兔抗人 N-cadherin 单克隆抗体、兔抗人 GSK-3 β 单克隆抗体、兔抗人 p-GSK-3 β 单克隆抗体、兔抗人 CDK6 单克隆抗体(批号分别为 ab76011、ab32391、ab75814、ab124821)购自英国 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 多克隆抗体、兔抗人 p-PI3K 多克隆抗体(批号分别为 AF7021、AF3241)购自美国 Affinity 公司;兔抗人 PI3K 单克隆抗体、兔抗人 Akt 单克隆抗体、兔抗人 p-Akt 单克隆抗体、兔抗人 Cyclin D1 单克隆抗体(批号分别为 4249T、4691T、4060T、

2978T)购自美国 CST 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 S0001)购自美国 Affinity 公司。

1.3 仪器

Heraguard ECO 型超净工作台(美国 Thermo 公司);BX51TF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);FTC-8000 型 LightCycler® 96 型 qRT-PCR 仪(瑞士罗氏公司);小型垂直电泳槽、PowerPac Basic 型小型 Trans-Blot 转印槽(美国 Bio-Rad 公司);c600 型多功能分子成像分析系统(美国 Azure Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-10A 细胞用专用培养基培养;人乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。当细胞融合度达到 80%~90%,用 TrypsinEDTA 溶液消化,1 000 r/min 离心 5 min,按 1:2 进行传代再培养。

2.2 细胞转染及分组

使用 riboFECT™ CP 试剂盒和 Ribo™ lncRNA Smart Silencer 试剂在 MDA-MB-231 细胞中沉默 CCAT1 表达。CCAT1 siRNA 的靶序列、以在人转录组中没有靶标的 siRNA 作为非靶标对照(si-NC),均由广州锐博生物技术有限公司合成。用 riboFECT™ CP 转染试剂在 6 孔板中以 30%~50% 的细胞密度进行 siRNA 转染,并将细胞孵育 48 h。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,以 200 μ g/mL DP 处理的细胞作为 DP (200 μ g/mL) 组;将 si-NC、si-CCAT1 分别转染至 MDA-MB-231 细胞中,作为 siNC、siCCAT1 组;将 siNC、siCCAT1 分别转染至 MDA-MB-231 细胞中再用 200 μ g/mL DP 处理作为 siNC + DP (200 μ g/mL)、si CCAT1 + DP (200 μ g/mL) 组;阴性对照组加入含或不含血清的 DMEM 培养液。

2.3 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期的细胞,Trypsin-EDTA 胰酶消化后,制成单细胞悬液,将 3 $\times 10^3$ 个细胞接种到 96 孔板中使其贴壁过夜,将培养液更换为含不同质量浓度(100、200、400、800 μ g/mL) DP 的新鲜培养基,或将细胞按照“2.2”项下方法处理。设置空白组(不接种细胞和加入不含药物的培养基)、对照组(只接种细胞和加入不含药物的培养基),每组设 4 个复孔。分别处理 12、24 和 48 h,或将细胞按照“2.2”项下方法处理细胞,孵育 48 h。随后加入 CCK-8 工作液

(10 μL /孔), 培养箱中放置 2.5 h 后, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 生物信息学技术

在线数据库 AnnoLnc2 (<http://annolnc.gao-lab.org/>) 和 RNAinter (www.rnainter.org/search/) 预测与 CCAT1 相互作用的 miRNA, 通过取交集筛选出 miRNA。然后, 通过在线数据库 ENCORI (<http://starbase.sysu.edu.cn>) 预测 miRNA 的下游靶基因。再用 DAVID 在线软件对交集出来的靶基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.5 qRT-PCR 检测 CCAT1 基因表达

收集各组细胞后, 用 RNAiso Plus 试剂盒提取总 RNA, 超微量核酸蛋白测量仪在 260 nm/280 nm 波长处检测 RNA 浓度。根据试剂盒说明书使用 riboSCRIPTTM mRNA/lncRNA RT-qPCR Starter Kit 试剂盒通过 qRT-PCR 法检测各组细胞 CCAT1 的表达水平, CCAT1 引物由广州锐博生物技术有限公司提供, GAPDH 引物由北京博迈德生物提供, 引物序列见表 1。去除基因组 DNA 反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min 或室温 5 min; 反转录反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 CCAT1 相对表达。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	长度/bp
GAPDH	F: AGTTCACGCGCACAGTCAAG	252
	R: TCTCATGGTTCACGCCCATC	
CCAT1	F: CACCTACGCATACCTCTGCTTC	141
	R: TGATTGCTCCTGTTCCCTTTG	

2.6 划痕实验

使用 Mark 笔在 6 孔板的背面作均匀穿过孔的直线, 每孔穿过 3 条线。取对数生长期的细胞, Trypsin-EDTA 胰酶消化后, 将细胞以 1×10^6 个/孔均匀接种于 6 孔板中并加入完全培养基, 待细胞长到 85%~90%, 更换为无血清培养基培养细胞 12 h。随后用 200 μL 的无菌枪头作每孔中预先所画横线的垂线, PBS 清洗 2 遍以除去漂浮的细胞, 随后按“2.2”项下分组处理细胞后, 于倒置显微镜随机选择 3 个独立视野拍下 0 h 划痕照片后, 在培养箱中培养 48 h, 在 0 h 拍摄的区域拍下 48 h 划痕愈合的照片。

$$\text{迁移率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.7 Transwell 实验

Matrigel 基质胶、DMEM 培养基按 1:8 比例稀释混匀后, 加入 40 μL 均匀铺于 Transwell 上室底部, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h 待其凝固, 吸去上清液后, 按“2.2”项下分组处理过的 MDA-MB-231 细胞密度调整为 5×10^5 个/mL, 取 100 μL 加入上室中, 下室每孔加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 500 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 18 h, 结束后用棉签拭子擦除小室上层未侵袭的细胞, 4% 组织细胞固定液固定, 0.1% 结晶紫染色。最后, 倒置显微镜下随机选择 5 个区域进行拍照, 并人工计数, 计算细胞侵袭率。

$$\text{细胞侵袭率} = \text{各组细胞侵袭数量} / \text{空白组细胞侵袭数量}$$

2.8 Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、Cyclin D1 和 CDK6 蛋白表达

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养过夜, 细胞贴壁后, 用预冷 PBS 清洗 2 遍, 按“2.2”项下分组处理细胞 48 h, 收集细胞, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 按照说明书加入合适比例的 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min, 使蛋白变性。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清并分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜; 于 5% 脱脂牛奶室温封闭 60 min 后, 分别加入 GAPDH (1:3 000)、E-cadherin (1:1 000)、N-cadherin (1:5 000)、Vimentin (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:2 000)、GSK-3 β (1:5 000)、p-GSK-3 β (1:1 000)、Cyclin D1 (1:1 000)、CDK6 (1:5 000) 抗体, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:3 000), 于室温摇床孵育 2 h 后, 使用 ECL 化学液显色, Western 印迹成像系统拍照, Image J 软件测定蛋白条带的灰度值, 并进行统计分析。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 多样本比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 CCAT1 在人乳腺癌组织和细胞中的表达

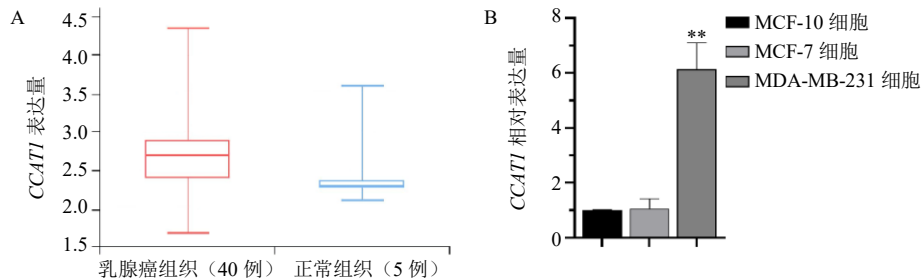
lnCAR database 在线数据工具分析显示, 与正常乳腺组织相比, CCAT1 在乳腺癌组织中表达显著上调 (图 1-A)。与 MCF-10A 及 MCF-7 细胞相比,

CCAT1 在三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达显著上调 ($P < 0.01$, 图 1-B)。此外, 另有研究表明, *CCAT1* 高表达组乳腺癌患者总生存期和无进展生存期明显短于 *CCAT1* 低表达组, 且 *CCAT1* 的表达是乳腺癌患者总生存期和无进展生存期的不良预后因素^[24]。上述结果表明, *CCAT1* 在乳腺癌组织和

细胞系中高表达并与患者生存期较短显著相关。

3.2 DP 联合 siCCAT1 对乳腺癌细胞活力的影响

为了检测 DP 对乳腺癌细胞毒性的影响, 使用了 2 种乳腺癌细胞系 (MCF-7 和 MDA-MB-231), 和正常乳腺上皮细胞 (MCF-10A) 来评估 DP 对乳腺癌的选择性。如图 2-A~C 所示, DP 呈剂量和时

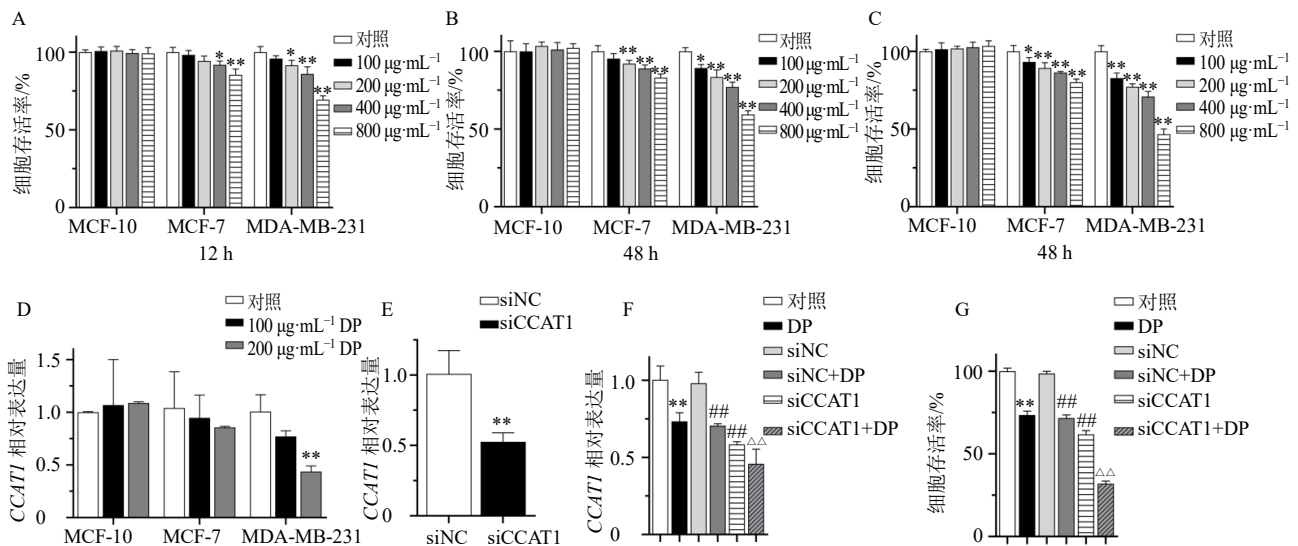


A-lncAR database 在线数据工具分析 *CCAT1* 在乳腺癌组织及邻近正常组织中的差异表达; B-qRT-PCR 分析乳腺癌细胞系 (MCF-7、MDA-MB-231) 和人正常乳腺上皮细胞系 (MCF-10A) 中 *CCAT1* 的相对表达; ** $P < 0.01$ 。

A-lncAR database online data tool analyzes the differential expression of *CCAT1* in breast cancer tissues and adjacent normal tissues; B-relative expression of *CCAT1* in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231) and human normal breast epithelial cell lines (MCF-10A) was analyzed by qRT-PCR; ** $P < 0.01$ 。

图 1 LncRNA *CCAT1* 在乳腺癌组织及细胞中的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Relative expression of lncRNA *CCAT1* in breast cancer tissues and cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A~C-分别用不同质量浓度 DP 处理正常乳腺上皮细胞 (MCF-10A) 和乳腺癌细胞系 (MCF-7 和 MDA-MB-231) 12、24、48 h, CCK-8 法检测细胞活力; D-100、200 µg·mL⁻¹ DP 处理正常乳腺上皮细胞 (MCF-10A) 和乳腺癌细胞系 (MCF-7 和 MDA-MB-231) 48 h 后, qRT-PCR 检测 *CCAT1* 表达; E-qRT-PCR 检测 lncRNA Smart Silencer NC#1 和 RiboTM h-CCAT1 Smart Silencer-3 转染效率; F-DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞中 *CCAT1* mRNA 表达的影响; G-DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 siNC 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 siNC+DP 组比较: △△ $P < 0.01$, 下同。

A~C-normal mammary epithelial cells (MCF-10A) and breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were treated with different concentrations of DP for 12, 24 and 48 h, respectively, and cell viability was detected by CCK-8 method; D-*CCAT1* expression level were detected by qRT-PCR after treatment of normal mammary epithelial cells (MCF-10A) and breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) with 100 and 200 µg·mL⁻¹ DP for 48 h; E-qRT-PCR assays for lncRNA Smart Silencer NC#1 and RiboTM h-CCAT1 Smart Silencer-3 transfection efficiency; F-effect of DP combined with siCCAT1 on *CCAT1* mRNA expression in MDA-MB-231 cells; G-effect of DP combined with siCCAT1 on viability of MDA-MB-231 cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs siNC group; △△ $P < 0.01$ vs siNC + DP group, same as below figures.

图 2 DP 下调 *CCAT1* 表达对乳腺癌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of DP downregulation of *CCAT1* expression on breast cancer cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

间相关性地抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞活力 ($P < 0.05$ 、 0.01)，而对 MCF-10A 细胞活力无明显影响。如图 2-D 所示，DP 对 MCF-10A 细胞中 *CCAT1* 的表达水平无显著影响，而呈剂量相关性地下调 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 *CCAT1* 的表达水平，且 DP 下调 MDA-MB-231 细胞中 *CCAT1* 的表达更为明显 ($P < 0.01$)。综合以上实验结果，本研究采用能够抑制细胞存活率且对 *CCAT1* 的表达有显著抑制作用的质量浓度为 $200 \mu\text{g/mL}$ 的 DP 及对 DP 抑制作用更为敏感的 MDA-MB-231 细胞进行后续研究。如图 2-E 所示，与 siNC 组比较，siCCAT1 的表达水平降低 ($P < 0.01$)。如图 2-F 所示，DP 和 siCCAT1 均能下调 MDA-MB-231 细胞中 *CCAT1* 的表达水平 ($P < 0.01$)，且 DP 联合 siCCAT1 更加显著的降低了 *CCAT1* 表达水平 ($P < 0.01$)。如图 2-G 所示，与 siNC 组比较，siCCAT1 可显著降低细胞活力 ($P < 0.01$)，且 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞活力的抑制作用更为明显 ($P < 0.01$)。综上所述结果表明，DP 联合 siCCAT1 抑制了 MDA-MB-231 细胞的活力。

3.3 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响

如图 3 所示，与对照组比较，DP 能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.01$)；与 siNC 组比较，siCCAT1 能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.01$)，且 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的抑制作用更为明显 ($P < 0.01$)。上述结果表明，DP 和 siCCAT1 抑制了 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭。

3.4 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程相关蛋白表达的影响

如图 4 所示，与对照组比较，DP 组 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.01$)，而 N-cadherin 和 Vimentin 的表达均下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与 siNC 组比较，siCCAT1 组 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.01$)，而 N-cadherin 和 Vimentin 的表达均下调 ($P < 0.01$)；DP 联合 siCCAT1 处理 MDA-MB-231 细胞后，E-cadherin 表达相较于 DP 组和 siCCAT1 组显著上调 ($P < 0.01$)，而 N-cadherin 和 Vimentin 的表达相较于单独应用 DP 或 siCCAT1 下调更为明显 ($P < 0.01$)。结果表明，DP 联

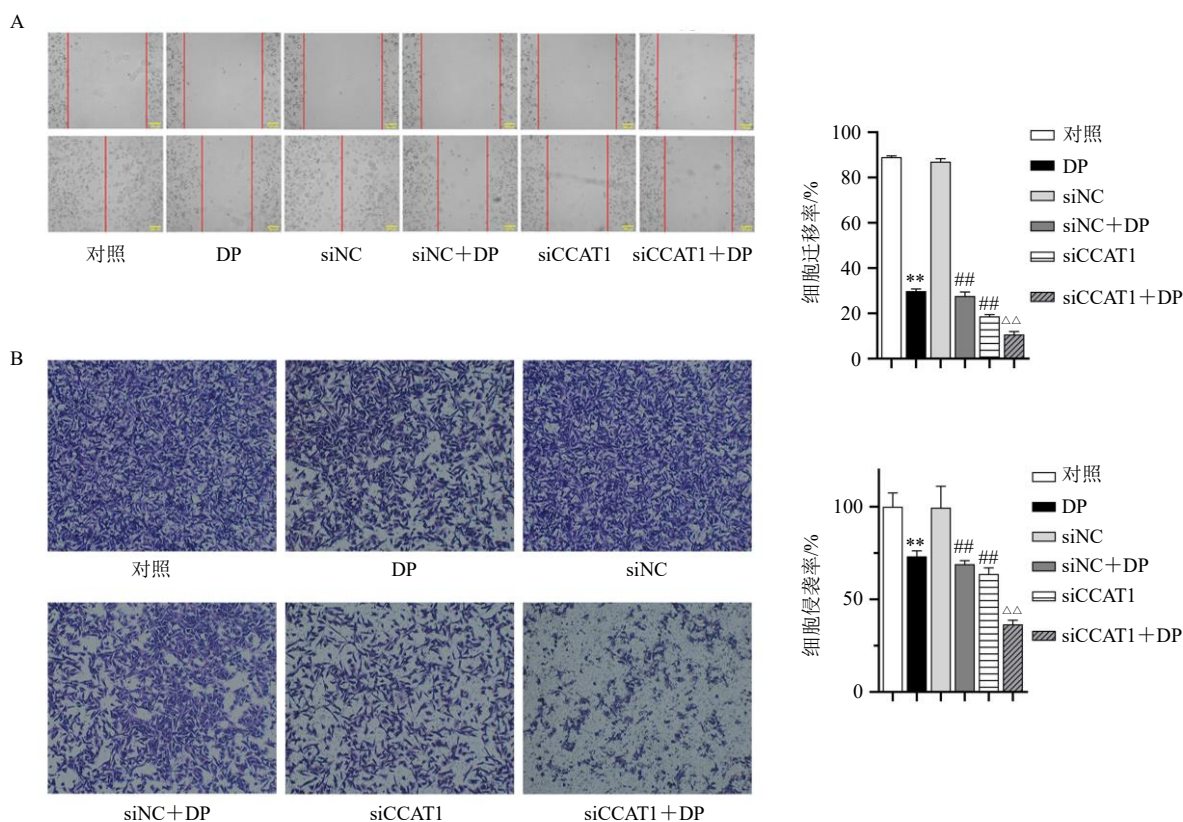


图 3 DP 和 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞迁移 (A) 和侵袭能力 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Effect of DP and siCCAT1 on migration (A) and invasion (B) ability of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

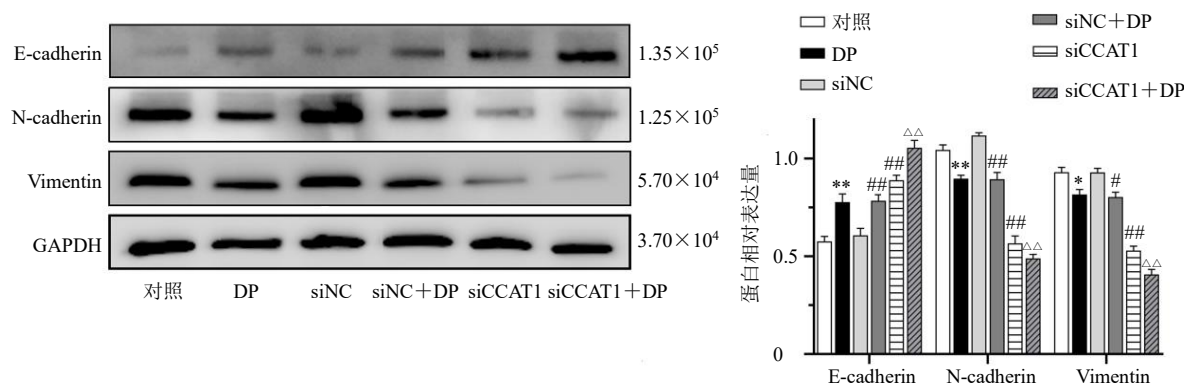


图 4 DP 和 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of DP and siCCAT1 on expressions of EMT process-related proteins in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

合 siCCAT1 抑制了 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程。

3.5 基于生物信息学技术分析 CCAT1 下游靶基因及其参与调控的相关信号通路

为了探索 CCAT1 参与调节 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制，通过在线数据库

AnnoLnc2 和 RNAinter 预测与 CCAT1 相互作用的 miRNA, 通过交集筛选出 5 个 miRNA, 分别是 miR-7-5p、miR-155-5p、miR-152-3p、miR-218-5p、miR-490-3p (图 5-A), 其中已有研究报道 miR-152-3p、miR-218-5p、miR-490-3p 与 CCAT1 之间存在互补

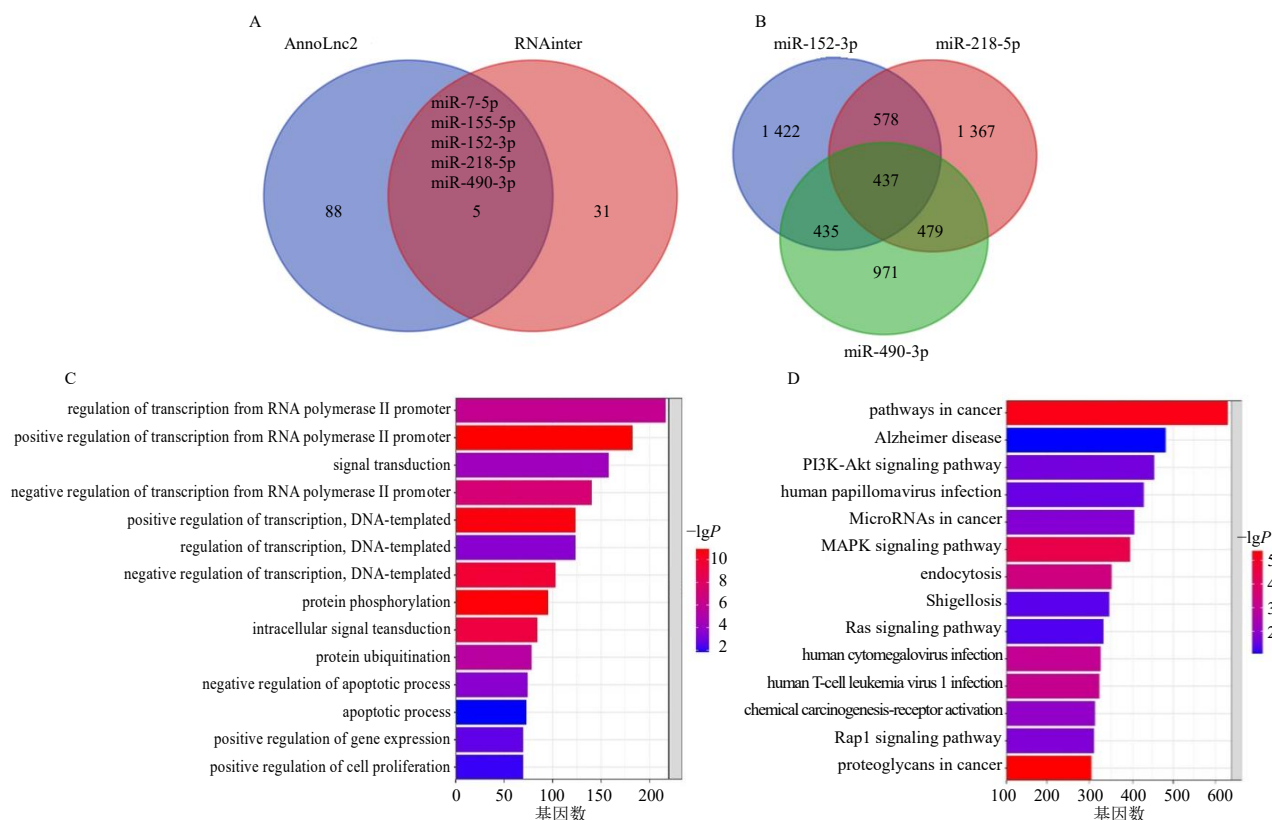


图 5 生物信息学技术分析 CCAT1 靶基因及其参与调控的相关信号通路

Fig. 5 Bioinformatics technology analysis of CCAT1 target genes and related signaling pathways involved in regulation

位点^[25-27]；然后，通过在线数据库 ENCORI 预测 miR-152-3p、miR-218-5p、miR-490-3p 下游靶基因，共取得 miRNA 相互交集的靶基因 1 929 个，其中包括 Akt 及 GSK-3 β （图 5-B）等。之后用 DAVID 在线软件对这 1 929 个靶基因进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析，发现这些靶基因主要富集在 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、信号转导、转录调控、DNA 模板和蛋白磷酸化等关键生物过程（图 5-C）；KEGG 信号通路富集结果显示，筛选出的靶基因主要富集在癌症、PI3K/Akt、MAPK 信号通路（图 5-D）。PI3K、Akt、GSK-3 β 是 Akt/GSK-3 β 信号通路中的关键调控分子。Cyclin D1 是 Akt/GSK-3 β 信号通路的下游效应分子，在肿瘤细胞中，Cyclin D1 与 CDK6 形成 Cyclin D1-CDK6 复合物，参与细胞生长、迁移、侵袭及凋亡的调控^[28]。因此，推测 CCAT1 可作为 Akt/

Cyclin D1/CDK6 信号通路的上游分子来参与调控 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭及迁移。

3.6 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞中 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路中关键蛋白表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，DP 下调了 MDA-MB-231 细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-GSK-3 β 及 Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平（ $P < 0.05$ 、 0.01 ）；与 siNC 组比较，siCCAT1 组 p-PI3K、p-Akt、p-GSK-3 β 及 Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平下调（ $P < 0.01$ ），且 DP 联合 siCCAT1 较单独应用 DP 和 siCCAT1 下调更为显著（ $P < 0.01$ ）。以上结果表明，DP 和 siCCAT1 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程的作用机制可能与抑制 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路有关。

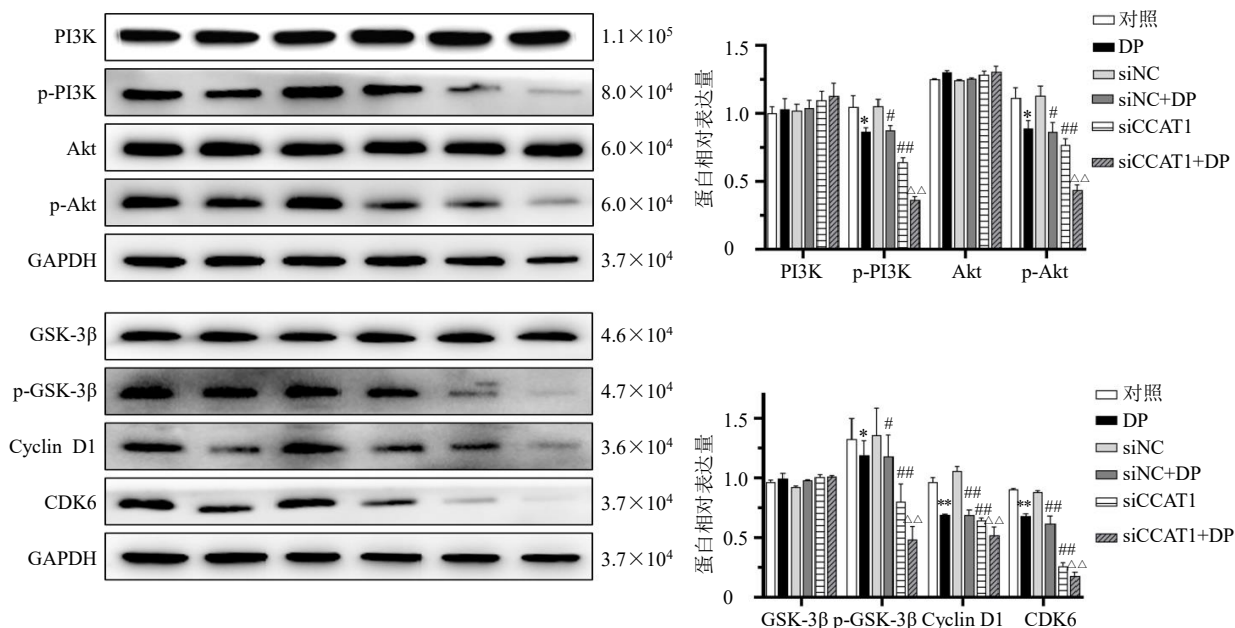


图 6 DP 联合 siCCAT1 对 MDA-MB-231 细胞中 Akt/Cyclin D1/CDK6 信号通路中关键蛋白表达的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ ）

Fig. 6 Effect of DP combined with siCCAT1 on expressions of key proteins in Akt/Cyclin D1/CDK6 signaling pathway in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

蒲公英有着悠久的药用历史，可用于治疗乳痈、瘰癧、疮疮肿毒等症^[29]。蒲公英的化学成分非常复杂，主要包括多糖^[30]、三萜^[31]、黄酮^[32]类化合物。近年来体内外实验研究表明，蒲公英全草提取物及蒲公英根提取物具有很强的抗癌活性，如蒲公英根提取物可通过降低活性氧水平和 B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）的表达来诱导黑色素瘤细胞凋亡^[33]；蒲公英根提取物还可通过抑制

PI3K/Akt、Ras/Raf/细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase, ERK）信号通路以及内源性胱硫氨酸- β -合成酶/硫化氢系统来影响食管鳞状细胞癌的进展^[34]；此外，蒲公英全草提取物与化疗药物紫杉醇和米托蒽醌联合用药后对癌细胞具有协同促凋亡作用，不仅能够增强前列腺癌 DU-145 细胞对紫杉醇和米托蒽醌的敏感性，而且能够降低人前列腺癌异种移植瘤小鼠的肿瘤负荷，且对小鼠无不良反应^[35]。DP 是从蒲公英根中提取的

最主要的有效活性成分之一,有研究报道 DP 可通过降低铁代谢和抑制血管生成在肝癌中发挥抗肿瘤作用^[6,8]。本研究首次揭示 DP 对乳腺癌细胞的抗癌作用,发现 DP 可抑制 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖,而对 MCF-10A 细胞活力影响不明显。

随着高通量测序技术的发展,LncRNA 的功能开始受到广泛的关注,越来越多的研究表明,LncRNA 通过调控基因转录和转录后处理参与包括乳腺癌在内的各种癌症的生理过程,如细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡、EMT 进程、干细胞分化和耐药性,并致力于从 LncRNA 中发现新的乳腺癌诊断、治疗和预后靶点^[36-37]。研究表明,Lnc RNA CCAT1 在乳腺癌组织中表达上调,且 CCAT1 高表达与乳腺癌患者的疾病进展和不良预后呈正相关,提示 CCAT1 可能参与乳腺癌的发生发展,是乳腺癌患者潜在的预后标志物^[24,38]。在此基础上,本研究通过数据库数据分析及 qRT-PCR 结果表明 CCAT1 在乳腺癌组织和细胞中表达上调。同时,为了进一步验证 CCAT1 在乳腺癌细胞中的表达情况,本研究采用 qRT-PCR 检测乳腺癌细胞中 CCAT1 mRNA 的表达,与之前的研究结果一致,本结果显示 CCAT1 在人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的表达高于 MCF-10A 细胞中的表达,且在 MDA-MB-231 细胞中异常高表达。此外,本研究发现,DP 可下调乳腺癌细胞中 CCAT1 的表达水平,提示 CCAT1 可能是 DP 治疗乳腺癌的潜在分子靶点。联合治疗被认为是恶性肿瘤临床治疗的最佳选择,在本研究中,DP 和 siCCAT1 联合治疗显著增强了单独使用 DP 或 siCCAT1 治疗对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的抑制作用,这表明 DP 联合 siCCAT1 可作为联合用药组合提高乳腺癌治疗效果。

LncRNA 作为内源性的“海绵”或 ceRNA 与 microRNA (miRNA) 相互作用,并通过调控下游靶基因影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[39],如 LncRNA SLC16A1-AS1 通过 miR-552-5p/WIF1 途径抑制乳腺癌的增殖和转移^[37]; LncRNA LRP11-AS1 通过 miR-149-3p/NRP2 轴促进 TNBC 细胞的增殖和迁移^[40]。在本研究中,通过数据库预测了与 CCAT1 相互作用的 miRNA,并检索了包括 GSK-3 β 在内的 miRNA 下游靶蛋白,通过对这些靶蛋白 KEGG 信号通路分析,筛选出富集最多的 PI3K/Akt 信号通路。越来越多的研究表明,Akt/GSK-3 β 信号通路在各种癌症中异常激活,并调控细胞增殖、凋亡、迁

移、侵袭和 EMT 进程,一旦 Akt/GSK-3 β 通路被抑制,癌症转移也会受到抑制^[41-42]。研究报道,猕猴桃根提取物通过抑制 Akt/GSK-3 β 信号通路,抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程,诱导细胞凋亡^[43]。在 TNBC 体内外生物模型中,抑制 Akt/GSK-3 β 信号通路可有效抑制 TNBC 增殖和转移,逆转 EMT 进程^[44]。与报道一致,本结果显示,DP 或 siCCAT1 均能有效抑制 MDA-MB-231 细胞中 Akt/GSK-3 β 信号通路关键蛋白的表达水平,且 DP 联合 siCCAT1 蛋白表达水平下调更为明显,因此推测,DP 联合 siCCAT1 可抑制 Akt/GSK-3 β 通路参与的 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为。研究表明,活化的 GSK-3 β 可以激活下游核内转录因子 Cyclin D1 蛋白的表达^[45],Cyclin D1 是一种重要的细胞周期蛋白,在正常细胞中,Cyclin D1 的表达水平受到严格调控,但在肿瘤细胞中表达上调,通过与 CDK6 结合形成具有活性的 Cyclin D1-CDK6 复合物来驱动细胞从 G₁ 期向 S 期过渡,而 Cyclin D1 的过表达会促进 Cyclin D1-CDK6 复合物的过度激活,导致细胞周期失控,从而加速肿瘤细胞增殖^[19],如上调 Cyclin D1 和 CDK6 的表达可以促进未成熟卵巢畸胎瘤细胞增殖^[46];山柰酚通过抑制 CDK6/Cyclin D1 通路抑制人胆囊癌 SGC996 和 GBC-SD 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡^[47];最近的研究发现 Cyclin D1、CDK6 过表达能够促进肿瘤细胞迁移、侵袭和 EMT^[23,48],因此推测 DP 和 siCCAT1 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 可能与抑制 Cyclin D1/CDK6 信号通路有关,进一步验证发现,DP 或 siCCAT1 均可下调 MDA-MB-231 细胞中 Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平,且 DP 联合 siCCAT1 处理 MDA-MB-231 细胞后 Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平较单独使用 DP 和 siCCAT1 处理的细胞中 Cyclin D1、CDK6 蛋白表达水平下调更为明显,提示 DP 和 siCCAT1 对 Cyclin D1/CDK6 信号通路存在一定的抑制作用,这为靶向 Cyclin D1、CDK6 抑制剂的研发提供了新的药理学依据。总之,本研究结果表明,DP 联合 siCCAT1 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的分子作用机制可能是通过阻断 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路来实现的。

越来越多的研究表明,LncRNAs 通过调节 EMT 进程的发生参与肿瘤进展^[49]。EMT 进程是肿瘤细胞迁移和侵袭的重要机制之一,在这个过程中,肿瘤

细胞从上皮细胞表型过渡到高侵袭性间充质表型，一旦激活 EMT 进程，肿瘤细胞就会发生一系列变化，包括紧密连接的溶解、顶端-基底极性的破坏和细胞骨架结构的重塑，这些变化都有利于肿瘤细胞迁移和侵袭^[50]，在分子水平上，上皮样标志物 E-cadherin 表达降低、间充质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 表达升高标志着细胞 EMT 进程的发生^[51]。多项研究表明，EMT 进程标志物可作为乳腺癌患者治疗和生存结果的预测因素^[52]。本研究结果显示，DP 和 siCCAT1 均可下调 MDA-MB-231 细胞中 N-cadherin、Vimentin 表达水平，上调 E-cadherin 表达水平，且 DP 联合 siCCAT1 下调 N-cadherin、Vimentin 表达水平，上调 E-cadherin 表达水平较单独使用 DP 和 siCCAT1 更为显著，提示 DP 通过下调 CCAT1 的表达抑制了 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程，且 DP 联合 siCCAT1 获得更佳的抗癌疗效，这为靶向 EMT 的抗乳腺癌新药组合的开发提供了新的理论依据。

综上，本研究首次证实了 DP 能够以剂量相关性的方式下调 MDA-MB-231 细胞中 CCAT1 的表达，此外，DP 和 siCCAT1 均能抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT，且 DP 联合 siCCAT1 的抑制作用更显著，这种抑制作用可能是通过阻断 Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路来实现的（图 7）。本研究为 DP 治疗 TNBC 提供了药理学依据，为以 CCAT1 为靶点研发治疗乳腺癌靶向药物及药物组合提供了依据。然而，DP 抗乳腺癌

作用是通过多途径、多靶点实现的，后续还需进一步完善其抗乳腺癌的其他作用机制。此外，本研究为 DP 通过抑制 CCAT1/Akt/GSK-3 β /Cyclin D1/CDK6 信号通路抗 TNBC 提供了体外实验依据，研究结果缺乏临床应用性，未来需要通过动物体内实验更深一步验证 DP 抗 TNBC 的分子作用机制，以使其能够尽早进入临床，为肿瘤治疗提供新的方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Shen M Y, Pan H W, Chen Y X, *et al.* A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy [J]. *Open Med*, 2020, 15(1): 1143-1149.
- [3] Liu S Y, Chen W Q, Hu H, *et al.* Long noncoding RNA PVT1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by binding miR-128-3p and UPF1 [J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23(1): 115.
- [4] Yang M H, Baek S H, Ha I J, *et al.* Brassinin enhances the anticancer actions of paclitaxel by targeting multiple signaling pathways in colorectal cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(7): 3875-3885.
- [5] 刘晓燕, 龙凤, 赵玉, 等. 蒲公英中有效成分抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3391-3400.
- [6] Ren F, Wu K X, Yang Y, *et al.* Dandelion polysaccharide exerts anti-angiogenesis effect on hepatocellular carcinoma by regulating VEGF/HIF-1 α expression [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 460.
- [7] 刘炜熹, 陈帅, 刘磊, 等. 蒲公英多糖的研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(10): 214-219.
- [8] Ren F, Yang Y Y, Wu K X, *et al.* The effects of dandelion polysaccharides on iron metabolism by regulating hepcidin via JAK/STAT signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7184760.
- [9] 牛虎. 蒲公英多糖对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [10] 田苗苗, 刘扬, 修海楠, 等. 蒲公英提取物对 SK-BR-3、T47D 乳腺癌细胞增殖的影响 [J]. *吉林中医药*, 2020, 40(10): 1343-1347.
- [11] Schmitt A M, Chang H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 452-463.
- [12] 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): 227-236.

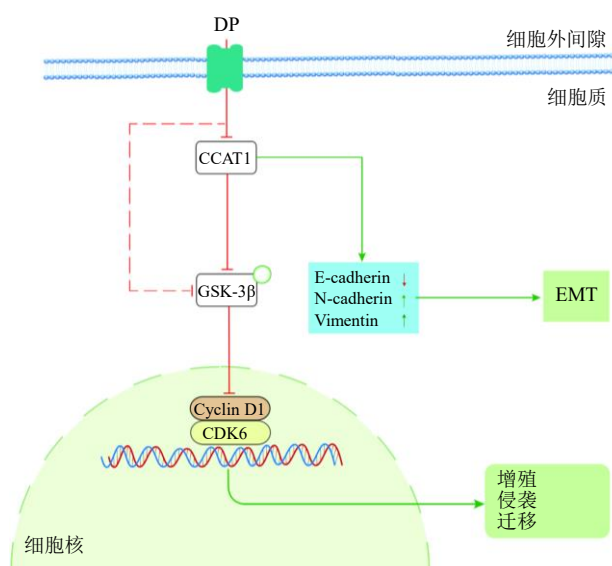


图 7 DP 在 MDA-MB-231 细胞中的抗肿瘤分子机制
Fig. 7 Molecular mechanism of DP against tumor in MDA-MB-231 cells

- [13] 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*, 2019, 11(14): 4858-4875.
- [14] Lou S M, Xu J, Wang B L, *et al.* Downregulation of lncRNA AFAP1-AS1 by oridonin inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51(8): 814-825.
- [15] Li Y L, Ye Y, Chen H Y. Astragaloside IV inhibits cell migration and viability of hepatocellular carcinoma cells via suppressing long noncoding RNA ATB [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 134-141.
- [16] Gao L, Shao T, Zheng W, *et al.* Curcumin suppresses tumor growth of gemcitabine-resistant non-small cell lung cancer by regulating lncRNA-MEG3 and PTEN signaling [J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(7): 1386-1393.
- [17] Zhu H H, Zhao H Y, Zhang L J, *et al.* Dandelion root extract suppressed gastric cancer cells proliferation and migration through targeting lncRNA-CCAT1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1010-1017.
- [18] Huang G, Ma L L, Shen L, *et al.* MIF/SCL3A2 depletion inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via the AKT/GSK-3 β pathway and cell iron death [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(12): 3410-3422.
- [19] Shi Q F, Li Y D, Li S Y, *et al.* LncRNA DILA1 inhibits Cyclin D1 degradation and contributes to tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5513.
- [20] Wang Q L, Han J X, Xu P, *et al.* Silencing of LncRNA SNHG16 downregulates cyclin D1 (CCND1) to abrogate malignant phenotypes in oral squamous cell carcinoma (OSCC) through upregulating miR-17-5p [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 1831-1841.
- [21] Wang J, Cai H, Liu Q L, *et al.* Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703-718.
- [22] Zhai Y N, Liu Y, Wang Z, *et al.* Long non-coding RNA LINC00313 accelerates cervical carcinoma progression by miR-4677-3p/CDK6 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 2213-2226.
- [23] Guo Z, Jia H Y, Ge J K. miR-206 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma by inhibiting CDK6 expression [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(3): 750-758.
- [24] 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): 9440-9445.
- [25] Zhang C X, Wang W Y, Lin J, *et al.* lncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion [J]. *Int Braz J Urol*, 2019, 45(3): 549-559.
- [26] Hong J, Hong A L, Tu H S, *et al.* LncRNA CCAT1 facilitates the proliferation, invasion and migration of human laryngeal squamous cell carcinoma cells via the miR-218-5p/BMI1 [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12961.
- [27] Cai X W, Dai Y H, Gao P, *et al.* LncRNA CCAT1 promotes prostate cancer cells proliferation, migration, and invasion through regulation of miR-490-3p/FRAT1 axis [J]. *Aging*, 2021, 13(14): 18527-18544.
- [28] Wang Q, Wu S Q, Gu Y N, *et al.* RASAL2 regulates the cell cycle and cyclin D1 expression through PI3K/AKT signalling in prostate tumorigenesis [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 275.
- [29] 邹传宗, 王红娟, 李纪纲, 等. 蒲公英对急性高尿酸血症大鼠的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(4): 170-172.
- [30] Gao J Y, Zhu L, Huang J, *et al.* Effect of dandelion root polysaccharide on the pasting, gelatinization, rheology, structural properties and *in vitro* digestibility of corn starch [J]. *Food Funct*, 2021, 12(15): 7029-7039.
- [31] Lin C J, Liu S T, Yang R C, *et al.* Anticancer effects of *Taraxacum* via cell cycle arrest, necrosis, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(2): 569-587.
- [32] Zhang Y, Hu Y F, Li W, *et al.* Updates and advances on pharmacological properties of *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz and its potential applications [J]. *Food Chem*, 2022, 373(Pt A): 131380.
- [33] Chatterjee S J, Ovadje P, Mousa M, *et al.* The efficacy of dandelion root extract in inducing apoptosis in drug-resistant human melanoma cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 129045.
- [34] Duan X F, Pan L M, Deng Y Y, *et al.* Dandelion root extract affects ESCC progression via regulating multiple signal pathways [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 9486-9502.
- [35] Nguyen C, Mehaidli A, Baskaran K, *et al.* Dandelion root and lemongrass extracts induce apoptosis, enhance chemotherapeutic efficacy, and reduce tumour xenograft growth *in vivo* in prostate cancer [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 2951428.
- [36] Jin H, Du W, Huang W T, *et al.* lncRNA and breast cancer: Progress from identifying mechanisms to challenges and opportunities of clinical treatment [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 25: 613-637.
- [37] Jiang B, Xia J, Zhou X D. Overexpression of lncRNA

- SLC16A1-AS1 suppresses the growth and metastasis of breast cancer via the miR-552-5p/WIF1 signaling pathway [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 712475.
- [38] Selem N A, Youness R A, Gad M Z. What is beyond LncRNAs in breast cancer: A special focus on colon cancer-associated Transcript-1 (CCAT-1) [J]. *Noncoding RNA Res*, 2021, 6(4): 174-186.
- [39] Fan Y R, Sheng W W, Meng Y, *et al.* LncRNA PTENP1 inhibits cervical cancer progression by suppressing miR-106b [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 393-407.
- [40] Li P, Zeng Y, Chen Y D, *et al.* LRP11-AS1 promotes the proliferation and migration of triple negative breast cancer cells via the miR-149-3p/NRP2 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 116.
- [41] Li J, Gong X, Jiang R, *et al.* Fisetin inhibited growth and metastasis of triple-negative breast cancer by reversing epithelial-to-mesenchymal transition via PTEN/Akt/GSK3 β signal pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 772.
- [42] Chen L Y, Wu Q M, Xu X Y, *et al.* Cancer/testis antigen LDHC promotes proliferation and metastasis by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β -signaling pathway and the in lung adenocarcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 398(2): 112414.
- [43] Gan C C, Jin Z, Wei X P, *et al.* *Actinidia chinensis* Planch. root extract inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells via the AKT/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2021, 59(4): 226-235.
- [44] He Y, Sun M M, Zhang G G, *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [45] Zhang Z W, Cui Z H, Xie Z L, *et al.* Deubiquitinase USP5 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation by stabilizing cyclin D1 [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10(10): 3995-4011.
- [46] Chen M L, Zhang M, Xie L, *et al.* LINC00324 facilitates cell proliferation through competing for miR-214-5p in immature ovarian teratocarcinoma [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 397-407.
- [47] Liu Z Q, Yao G L, Zhai J M, *et al.* Kaempferol suppresses proliferation and induces apoptosis and DNA damage in human gallbladder cancer cells through the CDK4/CDK6/cyclin D1 pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1311-1321.
- [48] Montalto F I, de Amicis F. Cyclin D1 in cancer: A molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2648.
- [49] Deng X Y, Xiong W, Jiang X J, *et al.* LncRNA LINC00472 regulates cell stiffness and inhibits the migration and invasion of lung adenocarcinoma by binding to YBX1 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 945.
- [50] Zhang N, Ng A S, Cai S J, *et al.* Novel therapeutic strategies: Targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): e358-e368.
- [51] Noyan S, Andac Ozketen A, Gurdal H, *et al.* miR-770-5p regulates EMT and invasion in TNBC cells by targeting DNMT3A [J]. *Cell Signal*, 2021, 83: 109996.
- [52] Li Z, Li C, Wu Q, *et al.* MEDAG enhances breast cancer progression and reduces epirubicin sensitivity through the AKT/AMPK/mTOR pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 97.

[责任编辑 李亚楠]