

分类号 _____
学校代码 10488

学号 201818601003
密级 _____

武汉大学

博士学位论文

**LncRNA ST8SIA6-AS1 通过调控
miR-410-3p/COL3A1 轴参与乳腺癌干
细胞（BCSCs）干性维持的分子机制
研究**

学位申请人：	胡浩
学 科 专 业：	生物医药工程
导 师：	张同存 教授
答 辩 日 期：	2023 年 5 月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Engineering**

**The molecular mechanism of lncRNA
ST8SIA6-AS1 regulates breast cancer stem
cells (BCSCs) stemness maintenance through
the miR-410-3p/COL3A1 axis**

Ph.D. Candidate: Hu Hao

Major: Biomedical Engineering

Supervisor: Prof. Zhang Tongcun

Wuhan University of Science and Technology

Wuhan, Hubei 430081, P.R.China

May, 2023

摘要

目的:

乳腺癌是世界女性排名第一的恶性肿瘤,进入 21 世纪以来,乳腺癌的发病率高速增长,到 2020 年全球新发乳腺癌病例已达到 226 万例,其中中国新增 42 万例。乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)是乳腺癌细胞中分布极少但极其重要的肿瘤细胞群,其强大的自我更新能力和多向分化潜能是乳腺癌异质性的的重要因素,同时也被广泛认为是乳腺癌发生发展、复发转移和耐药的根本原因。因此,研究 BCSCs 生物学特性及分子调控机制是具有重要的理论和临床意义。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)参与了 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程,lncRNA 的表达或功能异常与肿瘤的发生发展密切相关,其调控 BCSCs 的分子机制研究也特别重要。LncRNA ST8SIA6-AS1 已被发现在众多癌症中高表达,包括肝癌、肺癌、结肠癌等,但在乳腺癌的表达及调控的报道极少。本文研究的主要目的是探究 lncRNA ST8SIA6-AS1 在 BCSCs 干性维持中的作用及分子机制,并为以乳腺癌干细胞为靶点的治疗方案的开发提供相关理论依据。

方法:

利用生物信息学工具分析 ST8SIA6-AS1、miR-410-3p、COL3A1 在乳腺癌患者中的表达及预后情况;利用实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)检测细胞中目的基因或 RNA 的差异表达;利用慢病毒包装技术构建敲降或过表达目的基因的人乳腺癌细胞模型;利用细胞活力检测试剂盒-8(Cell Counting Kit-8, CCK8)检测细胞增殖能力及对化疗药物紫杉醇和多柔比星的耐药能力;利用 Transwell 实验,检测细胞迁移能力;利用克隆形成实验,检测细胞集落形成的情况;利用乳腺癌干细胞悬浮成球实验,检测干细胞微球体形成能力;利用荧光素酶报告实验和回复实验,验证 ST8SIA6-AS1、miR-410-3p、COL3A1 三者之间的调控关系;利用裸鼠异种移植瘤模型检测细胞的体内成瘤能力。

结果:

(1) ST8SIA6-AS1 有助于维持 BCSCs 干性特征: ST8SIA6-AS1 在乳腺癌

患者中高表达, 且 ST8SIA6-AS1 高表达组的乳腺癌患者的总体生存率 (Overall Survival, OS)、无病生存率 (Disease Free Survival, DFS) 和无远处转移的生存率 (Distant Metastasis-Free Survival, DMFS) 更差; ST8SIA6-AS1 在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中高表达; 敲低 ST8SIA6-AS1 后, 细胞的增殖能力、耐药能力、迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都显著减弱; 相反, 过表达 ST8SIA6-AS1 后, 细胞的增殖能力、耐药能力、迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都显著增强。

(2) COL3A1 参与调控 BCSCs 干性特征: COL3A1 在乳腺癌患者中高表达, 且 COL3A1 高表达组的乳腺癌患者的总体生存率 (OS) 和无病生存率 (DFS) 更差; COL3A1 在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中高表达; 敲低或过表达 ST8SIA6-AS1 后, COL3A1 的表达随之减弱或增强; 敲低 COL3A1 后, 细胞的增殖能力、耐药能力、迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都显著减弱; 相反, 过表达 COL3A1 后, 细胞的增殖能力、耐药能力、迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都显著增强; 在敲低 ST8SIA6-AS1 的细胞系中过表达 COL3A1 后, 细胞的迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都得到显著恢复; 在过表达 ST8SIA6-AS1 的细胞系中敲低 COL3A1 后, 细胞的迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都得到显著削弱。

(3) miR-410-3p 参与调控 BCSCs 干性特征: miR-410-3p 在乳腺癌患者中低表达, 且 miR-410-3p 低表达组的乳腺癌患者的总体生存率 (OS) 更差; miR-410-3p 在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中低表达; 过表达 miR-410 后, miR-410-3p 的表达水平显著升高; 过表达 miR-410 后, 细胞的增殖能力、耐药能力、迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都显著减弱。

(4) ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 干性特征: 敲低或过表达 ST8SIA6-AS1 后, miR-410-3p 的表达随之增强或减弱; 敲低或过表达 COL3A1 后, miR-410-3p 的表达也随之增强或减弱; 过表达 miR-410 后, ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 的表达显著减弱; 转染 miR-410-3p mimic 后, 与对照组相比,

ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 的野生型荧光素酶活性更低；在敲低 ST8SIA6-AS1 的细胞系中转染 miR-410-3p inhibitor 后，与对照组相比，COL3A1 的表达得到恢复，细胞的迁移能力、克隆形成能力、干细胞球体形成能力和 BCSCs 的干性标志物表达都得到恢复；ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 促进乳腺癌细胞体内成瘤，miR-410-3p 抑制乳腺癌细胞体内成瘤。

结论：

（1）ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 在乳腺癌和 BCSCs 中高表达，而 miR-410-3p 是低表达，且都与乳腺癌患者预后不良相关。

（2）ST8SIA6-AS1 正向调控 BCSCs 干性特征。

（3）COL3A1 有助于维持 BCSCs 干性特征，且是 ST8SIA6-AS1 下游的调控因子。

（4）miR-410-3p 负向调控 BCSCs 干性特征。

（5）ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 存在轴调控关系，且调控 BCSCs 干性特征。

关键词： ST8SIA6-AS1； miR-410-3p； COL3A1； BCSCs； 干性维持

Abstract

Objective:

Breast cancer is the number one malignant tumor among women in the world. Since the 21st century, the incidence of breast cancer has been increasing rapidly, with 2.26 million new cases of breast cancer worldwide by 2020, including 420,000 new cases in China. Breast cancer stem cells (BCSCs) are a very small but important population of breast cancer cells. Their strong self-renewal ability and multidirectional differentiation potential are important factors of breast cancer heterogeneity, and are also widely considered to be the root cause of breast cancer development, recurrence, metastasis and drug resistance. Therefore, it is of great theoretical and clinical significance to study the biological properties and molecular regulatory mechanisms of BCSCs. Long non-coding RNA (lncRNA) is involved in many important regulatory processes such as X chromosome silencing, genomic imprinting, chromatin modification, transcriptional activation, transcriptional interference, and intranuclear transport, etc. Abnormal expression or function of lncRNA is closely related to tumor development, and the study of its molecular mechanism of regulating BCSCs is particularly important. LncRNA ST8SIA6-AS1 has been found to be highly expressed in numerous cancers, including liver, lung, and colon cancers, but the expression and regulation in breast cancer have been rarely reported. The main objective of this study was to investigate the role and molecular mechanism of lncRNA ST8SIA6-AS1 in the maintenance of stemness in BCSCs and to provide a theoretical basis for the development of therapeutic regimens targeting BCSCs.

Methods:

Analysis of ST8SIA6-AS1, miR-410-3p, COL3A1 expression and prognosis in breast cancer patients using bioinformatics tools; detection of differential expression of target genes or RNAs in cells using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot (WB); construction of human breast cancer cell models with knockdown or overexpression of target genes using lentiviral packaging technology; the cell counting

kit-8 (CCK8) was used to detect cell proliferation and resistance to chemotherapeutic agents paclitaxel and doxorubicin; the Transwell assay was used to detect cell migration; detection of cell colony formation using clone formation assays; the ability of stem cells to form microspheres was examined using a sphere-forming assay; the regulatory relationship between ST8SIA6-AS1, miR-410-3p and COL3A1 was verified using a luciferase reporter assay and reversion assay; the *in vivo* tumorigenic ability of tumor cells was examined using a nude mouse xenograft tumor model.

Results:

(1) ST8SIA6-AS1 contributes to the maintenance of stemness characteristics of BCSCs: ST8SIA6-AS1 was highly expressed in breast cancer patients, and the overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and distant metastases-free survival (DMFS) of breast cancer patients in the high ST8SIA6-AS1 expression group were worse; ST8SIA6-AS1 was highly expressed in breast cancer cell lines and BCSCs; knockdown of ST8SIA6-AS1 significantly reduced the cell proliferation, drug resistance, cell migration, clone formation, stem cell sphere formation, and stemness marker expression of BCSCs; in contrast, overexpression of ST8SIA6-AS1 significantly enhanced the cell proliferation, drug resistance, cell migration, clone formation, stem cell sphere formation, and stemness marker expression of BCSCs.

(2) COL3A1 is involved in regulating stemness characteristics of BCSCs: COL3A1 was highly expressed in breast cancer patients, and the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of breast cancer patients in the high COL3A1 expression group was worse; COL3A1 was highly expressed in breast cancer cell lines and BCSCs; knockdown or overexpression of ST8SIA6-AS1 is followed by diminished or enhanced COL3A1 expression; knockdown of COL3A1 significantly diminished the cell proliferation, drug resistance, cell migration, clone formation, stem cell sphere formation, and stemness marker expression of BCSCs; in contrast, overexpression of COL3A1 significantly enhanced the cell proliferation, drug resistance, cell migration, clone formation, stem cell sphere formation, and stemness marker expression in BCSCs; overexpression of COL3A1 in cell lines with knockdown of ST8SIA6-AS1 resulted in significant restoration of the cell migration, clone formation, stem cell sphere formation,

and expression of stemness markers in BCSCs; knockdown of COL3A1 in cell lines overexpressing ST8SIA6-AS1 significantly impaired the cell migration, clone formation, stem cell sphere formation, and stemness marker expression of BCSCs.

(3) miR-410-3p is involved in regulating the stemness characteristics of BCSCs: miR-410-3p was lowly expressed in breast cancer patients, and the overall survival (OS) of breast cancer patients in the low miR-410-3p expression group was worse; miR-410-3p was lowly expressed in breast cancer cell lines and BCSCs; the expression level of miR-410-3p was significantly increased after overexpression of miR-410; the cell proliferation ability, drug resistance ability, cell migration ability, clone formation ability, stem cell sphere formation ability, and stemness marker expression of BCSCs were significantly diminished after overexpression of miR-410.

(4) ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 axis regulates the stemness characteristics of BCSCs: the expression of miR-410-3p was subsequently enhanced or diminished after knockdown or overexpression of ST8SIA6-AS1; the expression of miR-410-3p was also enhanced or diminished after knockdown or overexpression of COL3A1; the expression of ST8SIA6-AS1 and COL3A1 was significantly attenuated after overexpression of miR-410; lower luciferase activity of wild-type ST8SIA6-AS1 and COL3A1 group after transfection with miR-410-3p mimic compared to the control; restoration of COL3A1 expression, cell migration capacity, clone formation capacity, stem cell sphere formation capacity, and stemness marker expression in BCSCs after transfection of miR-410-3p inhibitor in cell lines with knockdown of ST8SIA6-AS1 compared to controls; ST8SIA6-AS1 and COL3A1 promote cellular tumorigenesis *in vivo*, and miR-410-3p inhibits cellular tumorigenesis *in vivo*.

Conclusion:

(1) ST8SIA6-AS1 and COL3A1 were highly expressed in breast cancer and BCSCs, while miR-410-3p was lowly expressed, and both were associated with poor prognosis in breast cancer patients.

(2) ST8SIA6-AS1 positively regulates the stemness characteristics of BCSCs.

(3) COL3A1 contributes to the maintenance of stemness characteristics in BCSCs and is a downstream regulator of ST8SIA6-AS1.

(4) miR-410-3p negatively regulates the stemness characteristics of BCSCs.

(5) ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 has an axial regulatory relationship and regulates the stemness characteristics of BCSCs.

Keywords: ST8SIA6-AS1; miR-410-3p; COL3A1; BCSCs; stemness maintenance

目 录

第 1 章 引言.....	1
1.1 乳腺癌的临床现状.....	1
1.1.1 乳腺癌的流行病学.....	1
1.1.2 乳腺癌的分型.....	1
1.1.3 乳腺癌的致病因素.....	2
1.1.4 乳腺癌的临床治疗.....	2
1.2 非编码 RNA	3
1.2.1 非编码 RNA 概述	3
1.2.2 长链非编码 RNA 概述	4
1.2.3 微小 RNA 概述	5
1.3 肿瘤干细胞.....	5
1.3.1 肿瘤干细胞的概念.....	5
1.3.2 肿瘤干细胞的分离鉴定.....	6
1.3.3 肿瘤干细胞的调控因素.....	7
1.3.4 基于肿瘤干细胞的治疗.....	11
1.4 本课题的目的和意义.....	13
第 2 章 LncRNA ST8SIA6-AS1 正向调控 BCSCs 干性维持	14
2.1 前言.....	14
2.2 实验材料.....	15
2.2.1 细胞系.....	15
2.2.2 主要试剂.....	15
2.2.3 主要实验耗材.....	18
2.2.4 主要实验仪器与设备.....	18
2.2.5 质粒.....	20
2.2.6 主要试剂配制.....	20
2.3 实验方法.....	21
2.3.1 细胞培养.....	21
2.3.2 细胞复苏与冻存.....	22
2.3.3 质粒构建与提取.....	22
2.3.4 细胞转染.....	25
2.3.5 慢病毒包装与侵染.....	25
2.3.6 慢病毒滴度分析.....	26
2.3.7 qRT-PCR 实验	26
2.3.8 蛋白质免疫印迹分析.....	29

2.3.9 细胞活力分析.....	31
2.3.10 细胞迁移分析.....	31
2.3.11 细胞克隆形成.....	31
2.3.12 生物信息学分析.....	32
2.3.13 数据统计.....	32
2.4 结果.....	32
2.4.1 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌中高表达且与预后不良相关.....	32
2.4.2 敲低 ST8SIA6-AS1 的表达抑制 BCSCs 干性.....	35
2.4.3 过表达 ST8SIA6-AS1 促进 BCSCs 的干性维持.....	38
2.5 讨论.....	40
第 3 章 LncRNA ST8SIA6-AS1 通过调控 COL3A1 维持 BCSCs 干性.....	42
3.1 前言.....	42
3.2 实验材料.....	43
3.2.1 细胞系.....	43
3.2.2 主要试剂.....	43
3.2.3 主要实验耗材.....	43
3.2.4 主要实验仪器与设备.....	43
3.2.5 质粒.....	43
3.2.6 主要试剂配制.....	44
3.3 实验方法.....	44
3.3.1 细胞培养.....	44
3.3.2 细胞复苏与冻存.....	44
3.3.3 质粒构建与提取.....	44
3.3.4 细胞转染.....	45
3.3.5 慢病毒包装与侵染.....	45
3.3.6 慢病毒滴度分析.....	45
3.3.7 qRT-PCR 实验.....	45
3.3.8 蛋白质免疫印迹分析.....	45
3.3.9 细胞活力分析.....	46
3.3.10 细胞迁移分析.....	46
3.3.11 细胞克隆形成.....	46
3.3.12 生物信息学分析.....	46
3.3.13 数据统计.....	46
3.4 结果.....	46
3.4.1 COL3A1 在乳腺癌中高表达且与预后不良相关.....	46
3.4.2 敲低 COL3A1 抑制 BCSCs 干性.....	49
3.4.3 过表达 COL3A1 促进 BCSCs 干性.....	51

3.4.4 ST8SIA6-AS1 通过调控 COL3A1 维持 BCSCs 干性	54
3.5 讨论	59
第4章 LncRNA ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 干性维持	61
4.1 前言	61
4.2 实验材料	61
4.2.1 细胞系	61
4.2.2 主要试剂	61
4.2.3 主要实验耗材	62
4.2.4 主要实验仪器与设备	62
4.2.5 质粒	62
4.2.6 主要试剂配制	62
4.3 实验方法	63
4.3.1 细胞培养	63
4.3.2 细胞复苏与冻存	63
4.3.3 质粒构建与提取	63
4.3.4 细胞转染	64
4.3.5 慢病毒包装与侵染	64
4.3.6 慢病毒滴度分析	64
4.3.7 qRT-PCR 实验	64
4.3.8 蛋白质免疫印迹分析	65
4.3.9 细胞活力分析	65
4.3.10 细胞迁移分析	65
4.3.11 细胞克隆形成	65
4.3.12 荧光素酶报告实验	65
4.3.13 裸鼠皮下成瘤	66
4.3.14 生物信息学分析	66
4.3.15 数据统计	66
4.4 结果	67
4.4.1 miR-410-3p 在乳腺癌中低表达	67
4.4.2 稳定过表达 miR-410 在细胞水平抑制 BCSCs 干性	69
4.4.3 荧光素酶实验验证 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴关系	72
4.4.4 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 干性维持	73
4.5 讨论	78
第5章 结论与展望	80
5.1 结论	80

5.2 展望.....	81
参考文献.....	82
附录 3 缩略语对照表	103
附录 4 质粒图谱	106

第1章 引言

1.1 乳腺癌的临床现状

1.1.1 乳腺癌的流行病学

乳腺癌仍然是全球最常见的女性癌症。在女性癌症中，乳腺癌约占 1/4 的确诊病例和 1/6 的死亡病例。根据世界卫生组织国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer, IARC）发布的 2020 年全球最新癌症负担数据显示，全球乳腺癌确诊新增人数达 226 万（11.7%），超越肺癌成为全球发病率第一的癌症，其次是肺癌（11.4%），结直肠癌（10.0%），前列腺癌（7.3%）和胃癌（5.6%）；乳腺癌死亡人数达 68 万（6.9%），死亡率位居世界第五^[1]。乳腺癌的发病率在世界所有区域都在增加，全球乳腺癌发病率以每年 3.1% 的速度上升，从 1980 年的 64.1 万例增加到 2010 年的 160 万例，再到 2020 年的 226 万例^[2]。全球范围内几乎一半的病例发生在发达国家，这一趋势主要是由于所谓的西方生活方式，与不良饮食、吸烟、过度压力和缺乏体育活动有关^[3]。就全球来看，高收入发达地区（北美地区每 10 万人确诊 92 人）的发病率是高于低收入不发达地区的（中非及东亚地区每 10 万人确诊 27 人）^[4, 5]。乳腺癌发病率最高的地区是北美、澳大利亚、新西兰以及北欧和西欧。此外，在高收入发达国家，乳腺癌通常在早期就被诊断出来，预后通常很好。然而，在低收入和中等收入不发达国家，如撒哈拉以南非洲国家和亚洲发展中国家，尽管发病率较低，但乳腺癌往往在较晚的阶段被诊断出来，且治疗途径有限，因此与较差的生存率有关^[6]。一些研究还表明，乳腺癌在亚洲女性（通常 40-50 岁）中比西方女性（通常 60-70 岁）更早出现 12-17 岁。此外，发展中国家被诊断为乳腺癌的患者比发达国家的患者年轻 10 岁左右。年轻患者（<35 岁）的比例从发达国家的约 10% 到亚洲发展中国家的高达 25% 不等。事实上，由于人口增长及老龄化程度越来越高，无论地区发展如何，乳腺癌都已经成为一个危险因素，严重威胁着全球女性的生命健康安全。

1.1.2 乳腺癌的分型

乳腺癌是非常异质性的，临床上按激素受体（雌激素受体，Estrogen receptor, ER 和孕激素受体，Progesterone receptor, PR）及人表皮生长因子受体 2（Human epidermal growth factor receptor 2, HER2, 也称 ERBB2）状态分为三种主要亚型：

腔内 ER 阳性和 PR 阳性（70%的患者），再可细分为 Luminal A 和 Luminal B；HER2 阳性（15%-20%的患者）；三阴性乳腺癌（Triple-Negative Breast Cancer, TNBC, 15%的患者）^[7]。增殖标记蛋白 Ki-67（Ki-67 Proliferation Marker Protein, Ki-67）的组织化学染色可用于区分 Luminal A 和 Luminal B 型乳腺癌，无需基因表达谱^[8]。然而，ER 阳性乳腺癌的发病率呈上升趋势^[9-12]。

乳腺癌也可以根据标准化的病理标准进行组织学诊断。最常见的乳腺癌组织学是浸润性导管癌（50%-75%的患者），也称为无特殊类型；其次是浸润性小叶癌（5%-15%的患者），其特征是上皮钙粘蛋白（Cadherin 1, CDH1）突变和分离性生长模式；其余患者为导管/小叶混合癌和其他更罕见的组织学。

1.1.3 乳腺癌的致病因素

遗传和非遗传危险因素都影响乳腺癌的发展。遗传因素包括高危和中度癌症易感性基因的致病突变（例如，BRCA1 或 BRCA2 和检查点激酶 2（Checkpoint Kinase 2, CHEK2））和乳腺癌相关的常见单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs）^[13]。最常见的乳腺癌易感基因 BRCA1 和 BRCA2 最早发现于 20 世纪 90 年代中期^[14,15]。BRCA1 和 BRCA2 通过同源重组参与 DNA 双链断裂的修复^[16-18]。其他高外显率和中外显率乳腺癌易感性基因还包括 CDH1、PTEN、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 11（Serine/Threonine Protein Kinase 11, STK11；也称为 LKB1）、TP53、共济失调毛细血管扩张突变、尼布林（Nibrin, NBN）和 BRCA2 的伴侣和定位子（Partner and localizer of BRCA2, PALB2）等，但所有这些种系突变都是罕见的^[19-33]。然而，他们仍然被包括在许多遗传风险基因检测小组中，并为突变携带者提供额外的筛查、预防选择和遗传咨询。其他更常见的低外显率 SNPs 也会影响乳腺癌风险。虽然它们单独带来的风险很小，但当总结为多基因风险评分（Polygenic Risk Score, PRS）时，它们的综合影响可能是巨大的^[34-36]。非遗传危险因素包括年龄增长、个人乳腺病理史（如不典型增生和小叶原位癌）、高乳腺 x 线摄影密度、接受胸部放射治疗（如霍奇金病的治疗）、高体重指数、外源性女性激素使用（如绝经期激素治疗（Menopausal hormone therapy, MHT）和激素类避孕药）、酒精、体育活动不足和生殖因素（月经初潮早、胎次低、母乳喂养期短和绝经期晚）^[37-47]。遗传和非遗传危险因素之间的区别不是绝对的，因为许多“非遗传”危险因素可能具有尚未完全阐明的遗传成分^[48-50]。

1.1.4 乳腺癌的临床治疗

乳腺癌的治疗是多学科的，它包括局部治疗（手术和放射治疗）和全身治疗，

乳腺癌的组织学和分子特征在很大程度上影响了治疗策略^[51]。局部和区域性乳腺癌治疗的主要手段仍然是手术干预。在 20 世纪上半叶，被诊断患有乳腺癌的女性通常接受根治性乳房切除术^[52]。而乳房保留手术是由 Fischer 等^[53]和 Veronesi 等^[54]首创的，在早期乳腺癌的治疗中，乳房肿瘤切除术和放疗的治疗效果与乳房切除术相当。全身治疗包括激素阳性疾病的激素治疗^[55,56]、化疗^[57,58]、HER2 阳性疾病的抗 HER2 治疗^[59]以及最近的免疫治疗^[60, 61]。乳腺癌未来的治疗概念旨在个体化治疗，并根据癌症生物学和治疗的早期反应来降低和加强治疗。

对于非转移性乳腺癌，治疗的主要目标是根除乳房和区域淋巴结的肿瘤，防止转移性复发，约 70-80%的早期非转移性乳腺癌患者是可以治愈的。非转移性乳腺癌的局部治疗包括手术切除和腋窝淋巴结取样或切除，并考虑术后放疗。系统治疗则可以是术前（新辅助治疗）、术后（辅助治疗）或两者兼有。乳腺癌亚型指导的标准的全身治疗，包括所有 HR+肿瘤的内分泌治疗（一些患者也需要化疗），所有 HER2+肿瘤的曲妥珠单抗定向抗体治疗加化疗（如果同时 HR 阳性，还给予内分泌治疗），以及三阴性乳腺癌的单独化疗。

对于转移性乳腺癌，治疗目标是延长生命和缓解症状。目前，几乎所有转移性乳腺癌患者都无法治愈。在转移性乳腺癌中使用的系统治疗的基本类别与上述的新辅助/辅助方法相同。局部治疗方式（手术和放疗）通常仅用于转移性疾病的姑息治疗。

1.2 非编码 RNA

1.2.1 非编码 RNA 概述

几十年来，对癌症生物学的研究主要集中在蛋白质编码基因的参与上。直到最近，人们才发现一整类分子，称为非编码 RNA（non-coding RNA，ncRNA），在塑造细胞活动中起着关键的调节作用。自那以后，对 ncRNA 生物学的大量研究表明，它们代表了一组多样化和普遍的 RNA，包括致癌分子和那些以抑制肿瘤的方式起作用的分子。ENCODE 项目报告说，人类基因组中至少有 80%具有生物活性，但人类 DNA 中只有一小部分编码为蛋白质。大量转录但未翻译成蛋白质的 RNA 可分为管家型 RNA（如核糖体 RNA，Ribosomal RNA，rRNA 和转运核糖核酸，transfer ribonucleic acid，tRNA）和调节型 RNA（如 miRNA、piRNA、lncRNA）^[62]。到目前为止，已经有许多 ncRNA 已被证明在正常细胞功能和疾病（包括癌症）中发挥关键作用，这些信息正在积极地转化为临床。一些小的 ncRNA 非常稳定，它们可以在血液中稳定存在，并可能成为在几滴血液中准确和敏感筛查人类主要癌症的基础^[63, 64]。此外，ncRNA 可以被靶向治疗，ncRNA

的递送可以基于现有的 RNAi 和寡核苷酸递送的基础上,去针对蛋白质编码的 mRNA^[65]。事实上, RNA 医学领域已经迎来了复兴,最近批准了第一种 RNAi 药物 Onpatro,用于降低神经退行性疾病遗传性转甲状腺素淀粉样变的 TTR 水平^[66]。此外,基于 miRNA 的药物疗法已经开展相关临床试验,用于癌症治疗^[67]。癌症的特征是细胞生长(增殖)失控,能够扩散到其他组织(转移),并通过细胞死亡的有序过程(凋亡)失去死亡的能力。ncRNA 的发现为了解癌症如何发展以及如何治疗癌症提供了一个新的维度,为了解基因组其余部分的影响提供了一个窗口。

1.2.2 长链非编码 RNA 概述

LncRNA 根据其与蛋白质编码基因的相对位置,可以至少分成四组:(1)基因间 lncRNA,即从两个蛋白质编码基因之间的 DNA 序列转录而来的 lncRNA;(2)内含子 lncRNA,是由蛋白质编码基因的内含子产生的 lncRNA;(3)重叠的 lncRNA,定义为转录物重叠已知的蛋白质编码基因;(4)反义 lncRNA,即与蛋白质编码基因转录方向相反。有趣的是,lncRNA 在进化上也不是高度保守的,只有 5%-6%的 lncRNA 含有保守序列^[68]。

与小型 ncRNA 相比,lncRNA 表现出广泛的机制多样性来发挥其功能作用,因此在这方面需要展开更多的讨论。首先,lncRNA 可以在顺式或反式中发挥作用,这意味着它们可以在自己的转录位点(顺式)介导局部作用^[69,70]或者它们在遥远的基因组或细胞位置(反式)运作^[71]。其次,lncRNA 可使其他调控分子(如 mRNA、miRNA、DNA)彼此接近,并与蛋白质(如染色质修饰复合体、转录因子、E3 连接酶、RNA 结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs))接近,本质上创建了一个灵活的分子支架,促进维持细胞活性所需的化学相互作用^[72]。就 lncRNA 通过直接结合蛋白复合物发挥作用而言,最典型的机制之一是引导染色质修饰复合物靶向基因启动子以影响转录抑制/激活^[73]。lncRNA 通常也结合转录因子,这可以对细胞转录程序产生广泛的下游影响^[74]。lncRNA 通常也被发现与调控 mRNA 加工和稳定性的 RBPs 直接接触^[75]。最后,lncRNA 可以作为核斑点和旁斑点中发现的调控分子的支架^[76]。除蛋白质外,lncRNA 还可以直接与核酸结合,介导其分子作用机制。另一种常见机制涉及 lncRNA 作为竞争性内源性 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA),通过对 miRNA 的海绵吸附,削弱 miRNA 对下游靶基因的抑制作用,构建 ceRNA 调控网络,形成轴调控机制,影响肿瘤的发生发展。考虑到广泛的调控机制和受影响的下流途径的多样性,许多 lncRNA (包括上面强调的几种)在体内实验中被发现是癌症进展的重要因素,并代表可能的治疗靶点也就不足为奇了。

1.2.3 微小 RNA 概述

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码 RNA 分子, 长度大约是 22nt, 高度保守, 存在于所有真核细胞中。一般来说, miRNA 是由编码或非编码转录本的内含子编码的, 而有些 miRNA 是由外显子区编码的^[77]。成熟的 miRNA 在识别特定的目标后, 通过与靶 mRNA 的 3'非翻译区的目标位点结合, 导致 mRNA 翻译抑制或降解, 在细胞分化、增殖和生存中发挥核心作用。miRNA 的天然结构允许它们靶向数百个转录本, 这表明它们是非常强大的调控者, 其异常表达可以扰乱大量的细胞信号通路, 从而对癌症的发生和发展产生深远的影响^[78, 79]。第一个 miRNA 于 1993 年在秀丽隐杆线虫中发现, 并鉴定为 lin-4 位点转录的小 RNA^[80]; 在 7 年后, 第一个哺乳动物 miRNA let-7 被发现^[81]。在此以后的短短二十多年里, miRNA 生物学领域得到了极大的发展。对 miRNA 在发育和疾病, 特别是癌症中的作用的深入了解和功能研究已经证实, miRNA 调控异常是许多癌症病例的原因。miRNA 作为肿瘤抑制因子或致癌基因, 牵涉到癌症的发生发展、转移和耐药等过程。例如, 已经证实, miRNA 特征可以区分正常和癌症组织以及特定癌症的不同亚型^[82]。在过去的几年里, miRNA 的研究已经深入调查了它们在耐药性中的作用, 阐明它们参与的化疗耐药性机制, 可以通过采用更多的特定药物或增加多种药物组合的协同效应来改善病人的治疗。化疗耐药癌细胞的 miRNA 表达模式与它们的母体化疗敏感细胞的表达模式相比, 往往有所不同^[83]。

1.3 肿瘤干细胞

1.3.1 肿瘤干细胞的概念

肿瘤干细胞 (Cancer Stem Cells, CSCs), 也被称为肿瘤起始细胞 (Tumor Initiating Cells, TICs), 是一种具有无限自我更新、多向分化和高度耐药的肿瘤细胞^[84]。CSCs 在肿瘤总质量中的百分比非常低 (占总癌细胞的 0.05-3%), 但具有很强的自我更新能力, CSCs 可以对称分裂成两个 CSC 或不对称分裂成一个 CSC 和一个子细胞, 以这种方式进行扩张, 过度促进细胞生长, 最终导致肿瘤形成^[85, 86]。CSCs 除了具有自我更新能力外, 还具有分化成不同细胞类型的能力。Bonnet 和 Dick 在 1997 年证明了 CD34+/CD38-白血病干细胞 (Leukemia stem cells, LSCs) 在重度联合免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID) 小鼠中具有分化和增殖的能力^[87]。CSCs 还可转分化为其他多系细胞以调节肿瘤的发生。Bussolati 等发现, 在注射人肾 CSCs 后, SCID 小鼠形成的肿瘤中, 大

部分肾 CSCs 分化为血管内皮细胞 (Endothelial cells, ECs) [88]。同时, 分化成血管内皮细胞并促进血管生成的 CSCs 也在其它癌症中被发现, 如胶质母细胞瘤 [89] 和肝癌 [90]。此外, CSCs 还具有复杂且有效的耐药机制。CSCs 可以高效表达 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白, 包括 MDR1 (ABCB1)、MRP1 (ABCC1)、ABCG2 等多种耐药蛋白, 这些蛋白保护白血病及部分实体肿瘤细胞免受药物损伤及诱导耐药 [91]。醛脱氢酶 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 是许多 CSCs 中的标记物, ALDH 可以消除氧化应激并增强对化疗药物的耐药性, 如唑烷、紫杉烷和铂类药物; ALDH 还能清除辐射引起的自由基, 增强辐射抵抗力 [92]。

1.3.2 肿瘤干细胞的分离鉴定

已知肿瘤组织中 CSCs 的比例很低, 且 CSCs 与正常干细胞还具有相似的转录因子和信号通路。因此, 分离和鉴定 CSCs 一直以来非常具有挑战性。然而, 越来越多的技术和手段已经出现。当前主流 CSCs 的分离鉴定技术有:

(1) 根据 CSCs 细胞表面的特定生物标记物进行分离鉴定; 使用的主要分离技术有荧光激活细胞分选 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和磁珠激活细胞分选 (Magnetic activated cell sorting, MACS) [93,94]。自从 Dick JE 首次使用 FACS 技术从白血病中筛选 CSCs 以来 [87], FACS 已成为应用最广泛的细胞分离技术。它可以一次进行多个生物标志物的分选, 纯度高, 特异性强。MACS 分离相对简单, 但技术繁琐。因此, 该方法对 CSCs 的活性要求较高 [95]。这两种方法都能有效地从大量细胞中分离出 CSCs。

(2) 侧群细胞 (side population, SP) 分离法; 1996 年, 古德尔博士观察到, 在骨髓细胞培养中加入 Hoechst 33342 后, 有少数细胞没有积累染料, 他声称这群少数细胞是侧群细胞。近年来, SP 细胞已在各种正常组织和肿瘤细胞中被发现。SP 细胞具有较高的同源性、自我更新和多向分化潜能 [96]。一些报道显示 ABCG2 在 SP 细胞中高度表达。ABCG2 与 CSCs 的耐药性高度相关, 被用作 CSCs 的表型标志物 [97,98], 包括卵巢癌 [99]、乳腺癌 [100]、肺癌 [101]、鼻咽癌 [102] 和肝细胞癌 [103]。SP 分选方法在 CSCs 的分离和鉴定中具有普遍适用性, 特别是具有未知细胞表面标记的 CSCs, 是 CSCs 研究的一种有效方法。

(3) CSCs 的克隆形成能力也被用于分离和鉴定: 肿瘤组织消化成单细胞后, 在含上皮生长因子 (Epithelial growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) 的无血清培养基中进行不贴壁低密度细胞培养 [104]。在这种情况下, 单个 CSC 会形成一个细胞集落或球体。Taylor 等利用这种集落形成实验成功地从多种神经肿瘤中分离出 CSCs [105]。然而, 该方法的细胞纯

化率较低, CSCs 特异性较差。体内有限稀释试验 (Limited dilution assay、LDA) 可用于评估 CSCs 活性。采用限制性稀释法对免疫缺陷小鼠进行低密度移植后, 通过 ELDA 软件分析可以鉴定 CSCs, 该方法受小鼠细胞密度和微环境的影响 [106]。

(4) 传统化疗药物主要作用于癌细胞, 而 CSCs 多被阻滞在 G0 期, 相对静止, 从而规避了化疗药物的杀伤作用。因此, CSCs 的耐药特性可用于分离和鉴定 CSCs [107]。既往研究表明, 放疗联合低氧培养也可用于 CSCs 的富集 [108]。最近, Rahimi 等使用 miR-302 宿主基因启动子在癌细胞中过表达新霉素, 并选择和收集了新霉素耐药 CSCs [109]。

1.3.3 肿瘤干细胞的调控因素

CSCs 可以起源于至少四种细胞类型, 包括正常干细胞、定向祖细胞、成熟细胞以及干细胞和其他突变细胞的融合。因此, 从正常细胞转化 CSCs 需要多个基因突变、表观遗传变化、不受控制的信号通路以及微环境的持续调节。本段将讨论转录因子、信号通路和微环境对 CSCs 存活、凋亡和转移的影响。详细描述如下:

(1) CSCs 中的主要转录因子: 转录因子 Oct4、Sox2、Nanog、Klf4 和 Myc 在 CSCs 中都是处于过表达状态, 这些转录因子在 CSCs 的生长调控中起着非常重要的作用。

①Oct4 是 Pit-Oct-Unc 家族的同源域转录因子, 被认为是最重要的转录因子之一, 有研究报道 Oct4 在 CSCs 中高表达 [110, 111]。Oct4 的高表达与胶质瘤等级呈正相关 [112], 并促进 HCC 干细胞的自我更新、化疗耐药性和致瘤性 [113]。在乳腺 CSCs 样细胞 (CD44+/CD24-) 中也观察到 Oct4 的高表达 [114]。因此, 这些研究证明了 Oct4 在 CSCs 中是一个多能因子。

②Sox2 属于高迁移率群转录因子家族, 在未分化胚胎干细胞 (Embryonic stem cell, ESCs) 的早期发育和维持中起着重要作用。它也是 CSCs 的关键转录因子之一。Rodriguez-Pinilla 等发现, 基底样乳腺癌中 Sox2 表达增加可能有助于表征低分化/干细胞表型 [115]。Hagerstrand et al 也发现高水平的 Sox2 可诱导异种移植胶质瘤 [116]。进一步研究表明, 敲除 Sox2 可抑制胶质母细胞瘤细胞增殖和致瘤性, 表明 Sox2 是维持肿瘤起始细胞 (TICs) 自我更新能力的基础 [117]。

③Nanog 是一种最早在 ESCs 中发现的同源异形盒 (homeobox, HOX) 结构域蛋白, 具有典型的自我更新和多功能转录调节功能。Nanog 在结直肠 CSCs 中过表达促进体内集落形成和肿瘤发生 [118]。在 43 例胰腺癌组织芯片分析中, Kaplan-Meier 分析显示 Nanog 高表达预示预后较差, 与患者生存期呈负相关 [119]。

这些研究表明, Nanog 在调节 CSCs 的自我更新和增殖中起着重要作用。

④Klf4 作为一种双功能转录因子, 根据不同的靶基因, 利用不同的机制激活或抑制转录。因此, Klf4 可以发挥致癌或抗癌作用, 这取决于所涉及的癌症类型。例如, Klf4 在非小细胞肺癌^[120]、肝癌^[121]、间变性脑膜瘤^[122]、膀胱癌^[123]等其他癌症中被发现表达下调。虽然这些数据清楚地证明了 Klf4 在这些癌症中具有抗癌作用, 但 Klf4 也可能是一种癌基因, 这是近十年来首次被证明。Klf4 在转化大鼠肾上皮细胞中过表达可诱导喉部鳞状细胞癌的发生^[124]。此外, Klf4 的缺失可抑制体内异种黑素瘤的生长^[125]。这些研究表明 Klf4 在不同 CSCs 中具有不同的功能。

⑤Myc 有三个家族成员 (C-Myc、N-Myc 和 L-Myc), 它们由原癌基因家族编码, 是基本螺旋-环-螺旋 (Basic helix-loop-helix, bHLH) 超家族 DNA 结合蛋白中的重要转录因子。Myc 调控大量蛋白质编码和非编码基因, 协调干细胞中的各种生物学过程, 如细胞代谢、自我更新、分化和生长。Myc 家族的三个成员在不同肿瘤中的表达不同, 如白血病中的 C-Myc 高表达^[126], 而非小细胞肺癌、前列腺癌、神经母细胞瘤和成髓母细胞瘤中的 N-Myc 高表达^[127, 128], L-Myc 在造血系统恶性肿瘤中高表达^[129]。研究也表明 Myc 在多形性胶质母细胞瘤干细胞中高表达, 诱导细胞增殖侵袭, 抑制细胞凋亡^[130]。人类和小鼠前列腺 CSCs 中 Myc 基因拷贝数增加也已被发现^[131]。这些研究表明 Myc 是在其他因素的帮助下诱导肿瘤发生的。

(2) CSCs 中的主要信号通路: 许多有助于正常干细胞的生存、增殖、自我更新和分化特性的信号通路在肿瘤发生或 CSCs 中被异常激活或抑制。许多内源性或外源性基因和 miRNAs 调节这些复杂的通路。这些信号通路不是单一的调节因子, 而是由多种信号介质交织而成的网络来调节 CSCs 的生长。因此, 本段落将描述信号通路如何调节 CSCs 生长。

①CSCs 中的 Wnt 信号通路: Wnt 信号通路的激活诱导休眠的 CSCs 转化为活跃的 CSCs, 通过 β -catenin 促进细胞周期进程, 增加下游 cyclin D1 和 Myc 的表达^[132]。此外, 长链非编码 RNA 和 miRNAs 也通过 Wnt 信号通路促进 CSCs 的自我更新。LncTCF7 招募 SWI/SNF 复合物来调节肝脏 CSCs 中 TCF7 启动子的表达^[133]。miRNA-1246、miR-19 和 miR-92a 抑制 CSCs 中 AXIN 和 GSK3 β 的表达^[134]。

②CSCs 中的 Notch 信号通路: Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体、CSL、DNA 结合蛋白等组成。许多关于 CSCs Notch 通路的研究表明, Notch 通路的激活可促进细胞存活、自我更新和转移, 并抑制细胞凋亡。异常 Notch 信号通路 (Notch1 和 Notch4) 促进 BRCA 和 HCC 干细胞的自我更新和转移^[135, 136]。此外, 一些细胞内基因也调控 Notch 信号通路。例如, MAP17 (也称为 PDZK1IP1,

PDZK1 相互作用的蛋白 1, PDZK1 interacting protein 1), 一种非糖基化的膜相关蛋白, 位于质膜和高尔基体上。MAP17 通过 PDZ 结合域与 NUMB 相互作用, 激活颈椎 CSCs 中的 Notch 通路^[137]。诱导型一氧化氮合酶通过 TACE/ADAM17 激活调节 Notch1 信号通路, 促进 CD24+CD133+肝 CSCs 的自我更新能力^[138]。在缺氧的情况下, Notch1 可诱导卵巢 CSCs 的迁移和侵袭^[139]。缺氧诱导的 Jagged 2 激活增强了乳腺 CSCs^[140]和肺 CSCs^[141]的细胞侵袭。这些研究表明 Notch 在调节 CSCs 的自我更新、生长和转移中起重要作用。

③CSCs 中的 JAK-STAT 信号通路: 该信号通路是一种受细胞因子刺激的信号转导通路。STAT3 的持续激活显著促进了乳腺 CSCs 的细胞存活和干性的维持^[142]。IL-10 在非小细胞肺 CSCs 中诱导细胞自我更新、迁移和侵袭^[143]。IL-6 通过激活下游的 Oct4 基因在乳腺癌中诱导非干细胞向癌干细胞样细胞的转化^[144]。HIF-1 α 通过 JAK1/STAT3 途径增强胶质瘤干细胞样细胞的自我更新^[145]。

④CSCs 中的 NF- κ B 信号通路: 核因子- κ B (Nuclearfactor kappa-B, NF- κ B) 是一种快速诱导转录因子, 由 5 种不同的蛋白 (p65、RelB、c-Rel、NF- κ B1 和 NF- κ B2) 组成。NF- κ B 通路在调节 CSCs 的炎症、自我更新或维持和转移方面具有重要的联系。CD44+细胞通过增加 RelA、RelB 和 IKK α 的表达并介导 p50/RelA (p50/p65) 二聚体的核激活来促进卵巢 CSCs 的自我更新、转移和维持^[146]。炎症介质前列腺素 E2 (Prostaglandin E2, PGE2) 通过磷酸肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K) 和 EP4-MAPK 通路激活 NF- κ B 参与结直肠 CSCs 的肿瘤形成、维持和转移^[147]。此外, 其他转录因子也通过 NF- κ B 通路抑制 CSCs 的自我更新和转移。FOXP3 与 NF- κ B 相互作用, 抑制 NF- κ B 下游 COX2 的表达, 影响结直肠癌细胞的自我更新和转移^[148]。过表达 miR-491 通过靶向抑制 ERKs 的 G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白 1 阻断 NF- κ B 在肝 CSCs 中的激活^[149]。这些数据表明 NF- κ B 信号通路在调控 CSCs 的凋亡、增殖和转移中起重要作用。

(3)CSCs 的微环境: CSCs 通过粘附分子和旁分泌因子与肿瘤微环境 (Tumor microenvironment, TME) 相互作用。肿瘤微环境为 CSCs 的自我更新和分化提供了适宜的空间, 保护了 CSCs 的遗传毒性, 提高了 CSCs 的化学和放射耐受性。TME 主要由肿瘤间质、邻近组织细胞、微血管、免疫细胞、免疫分子等组成。CSCs 不仅能适应 TME 的变化, 而且能影响 TME。同时, 肿瘤微环境还能促进 CSCs 的自我更新, 诱导血管生成, 招募免疫细胞和基质细胞, 促进肿瘤的侵袭和转移。详细描述如下:

①血管生态位微环境与 CSCs: 正常的血管是由 ECs、基底膜和顶层细胞组成, ECs 是血管内表面生成的基础。Calabrese 等人证明在脑肿瘤中 ECs 和 CSCs 之间可以直接接触^[150]。在其他癌症中, 如乳头状瘤和结直肠癌, CSCs 也在 ECs 附近发现^[151, 152]。研究还表明, CD133+/CD144-胶质瘤干细胞样细胞分化为癌细

胞和内皮祖细胞,最终分化为成熟的 ECs^[153]。CSCs 可通过诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 的分泌来促进肿瘤血管生成^[154]。

②低氧微环境与 CSCs: 缺氧是 CSCs 形成和维持的关键因素,缺氧微环境维持癌细胞的未分化状态,提高其克隆率,并诱导 CD133 作为 CSCs 特异性生物标志物的表达^[155,156]。缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs) 是调节细胞缺氧反应和抑制细胞凋亡的重要转录因子。HIFs 是一种异源二聚体,由 HIF α 和 HIF β 组成。HIF-1 α 在多形性成神经管细胞瘤和胶质母细胞瘤中调控 CSCs 的增殖和命运^[157],并激活 NF- κ B 通路促进 CSCs 生存和肿瘤发生^[158]。HIF-2 α 维持 CSCs 的存活和表型^[159]。HIFs 还可以调节 CSCs 的干性。有研究表明,CSCs 需要激活 HIF-1 α 和 HIF-2 α 来保证其在低氧条件下的自我维持^[160],并通过上调 Sox2 和 Oct4 基因来获得多能性^[156]。

③肿瘤相关巨噬细胞和 CSCs: 巨噬细胞有两种亚型: M1 和 M2 表型。M1 表型巨噬细胞具有抗炎和抗肿瘤作用,并分泌促炎因子,如白细胞介素-1 (Interleukin-1, IL-1)、IL-12、IL-23 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等。M2 表型巨噬细胞一般被认为是肿瘤相关巨噬细胞 (Tumor-associated macrophages, TAMs) 的表型,具有免疫抑制和促血管生成作用,被认为是一种促肿瘤细胞类型^[161,162]。M2 表型巨噬细胞分泌 C-C 趋化因子配体 17 (C-C motif chemokine ligand 17, CCL17)、CCL22、CCL24 和 IL-12 低表达,IL10 高表达。巨噬细胞分泌的细胞因子通过多种信号通路影响 CSCs 的增殖、致瘤转化或凋亡。有研究表明,M2 表型巨噬细胞分泌的 mucin-1 诱导非小细胞肺癌细胞转分化为表达 CD133 和 Sox2 的 CSCs^[163]。Jinushi 和同事还报道,TAMs 分泌 MFG-E8,维持结肠和乳腺 CSCs 的自我更新能力,敲除 MFG-E8 可显著抑制 SCID 小鼠的致瘤能力^[164]。TAMs 通过分泌 EGF 激活小鼠乳腺 CSCs 中的 STAT3/Sox2 信号通路,促进 CSCs 的自我更新能力^[165]。TAMs 分泌的 IL-8 也通过激活 JAK2/STAT3/Snail 通路诱导肝癌细胞的上皮细胞-间充质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)^[166]。

④癌症相关的成纤维细胞和 CSCs: 癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 是 TME 最重要的组成部分之一,TME 中的 CAFs 在 CSCs 的生成和维持中起着不可或缺的作用^[167]。CAFs 可将癌细胞转化为 CSCs。研究表明,CAFs 分泌转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 并激活相关通路增加 ZEB1 转录,从而刺激肺癌细胞进行 EMT 和 CSCs 转化^[168]。CAFs 分泌基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs),诱导 EMT 并促进肿瘤中干细胞特异性成分的生长。CAFs 和脂肪细胞也分泌瘦素,这增加了体外乳腺 CSCs 的球状率^[169]。CAFs 还通过其他信号通路调节 CSCs 的增殖。例如,CAFs

增加了 CCL2 的分泌, 激活 Notch1/STAT3 通路, 从而增加了干细胞标志物的表达, 上调了乳腺癌的球化率^[170]。CAFs 通过 cMet/FRA1/HEY1 信号通路调控 HCC 的 CSCs 可塑性^[171]。CAFs 分泌高水平的 IL-6, 通过 STAT3 Tyr705 磷酸化激活 Notch 信号, 从而促进 HCC 细胞的干细胞样特征^[172]。

⑤细胞外基质和 CSCs: 细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 是间充质和上皮血管中基质的一种不溶性结构成分, 包括胶原蛋白、弹性蛋白、氨基聚糖、蛋白聚糖和非胶原蛋白糖蛋白。在 HCC 中, 基质增加促进细胞增殖和化疗耐药性, 并增加 CSCs 相关标志物的表达, 包括 CD44、CD133、c-kit、CXCR4、Oct4 和 Nanog^[173]。ECM 中的透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 是 CD44 受体的配体, 可以在相互接触过程中调节 CSC 干性的获得和维持^[174]。ECM 还通过分子 MMP3 结合 Wnt 配体 Wnt5b, 导致乳腺上皮干细胞的扩增和增殖^[175]。此外, ECM 中的肌腱蛋白 C (Tenascin C, TN-C) 通过增加 Wnt 和 Notch 信号通路的活性来维持乳腺 CSCs 的稳定性^[176]。

1.3.4 基于肿瘤干细胞的治疗

临床治疗肿瘤的方法很多, 包括手术、化疗和放疗, 以消除肿瘤细胞, 但结果并不令人满意, 通常预后不佳。分子靶向治疗因其较高的特异性和有效性而表现出巨大的潜力, 在许多不同类型的癌症中取得了很多方面的成功, 使肿瘤治疗发生了革命性的变化。肿瘤干细胞在肿瘤的发生、发展、转移和复发中起着至关重要的作用, 是一种可行和潜在的肿瘤治疗靶点。在上文中列出了肿瘤干细胞独特的生物学特性, 在本节中, 总结了近年来针对肿瘤干细胞治疗肿瘤的策略。

(1) 临床试验中靶向 CSCs 相关表面生物标志物的药物: 靶向 CSCs 特异性表面生物标志物的单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAbs) 已成为一种新兴的癌症治疗技术。利妥昔单抗是一种 CD20 单抗, 是治疗滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma, FL) 和套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL) 的活性药物, 但也存在一些不可控的副作用^[177]。人源化 CD52 抗体 alemtuzumab 已被批准用于对烷基化剂和嘌呤无效的慢性淋巴细胞白血病 (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL) 患者的治疗。此外, CD20 和 CD52 抗体联合治疗难治性 CLL 是安全、无毒、可行和有效的^[178]。上皮细胞粘附分子 (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 是一种常见的 CSCs 生物标志物, 在临床试验中也受到了关注。Adecatumumab 是一种 EpCAM 抗体, 用于激素抵抗性前列腺癌患者, 结果表明 EpCAM 特异性抗体具有巨大的临床潜力^[179, 180]。针对 CSCs 表面标志物的最新抗体, 如 XmAb14045 (NCT02730312)、flotetuzumab (NCT02152956) 和 talacotuzumab (NCT02472145) 也在临床研究中。此外, 其他一些可以区分 LSCs

与其他细胞的标记物正在临床开发中,如 IL-1 受体辅助蛋白、CD27/70、CD33、CD38、CD138、CD93、CD99 等。然而, CSCs 表面表型在不同患者或不同癌症中可能存在差异,具有不同表型的不同 CSCs 群体可能共存。CSCs 也可分化或进化成不同的癌细胞,在复发时获得不同的表型。因此,临床试验中使用的策略应根据不同癌症的表型来确定。同时,将不同的表面抗体与相关化疗药物联合使用,可达到理想的治疗效果。

(2) 临床试验中靶向 CSCs 相关信号通路的药物:调控 CSCs 维持和存活的信号通路已成为癌症治疗的靶点,主要信号通路有 Wnt、Notch、JAK-STAT 和 NF- κ B 信号通路。

到目前为止,针对 Wnt 信号通路的几种药物已经进入临床试验阶段。Ipafricept (OMP-54F28) 是一类首创的重组融合蛋白,可拮抗 Wnt 信号。在临床实验 NCT02050178 中, ipafricept 联合 b-紫杉醇和吉西他滨治疗未治疗的 IV 期胰腺癌患者;在临床实验 NCT02092363 中, ipafricept 联合紫杉醇和卡铂治疗复发性铂敏感性卵巢癌患者;在临床实验 NCT02069145 中, ipafricept 联合索拉非尼治疗 HCC 患者。

目前临床上抑制 Notch 信号通路的方法主要有三种:分泌酶抑制剂 (γ -secretase inhibitor, GSI)、针对 Notch 受体或配体的抗体以及与其他方法联合治疗。一种选择性 GSI, RO4929097 在临床前和早期试验中表现出良好的抗肿瘤活性^[181, 182],但对转移性结直肠癌不佳^[183]。一种口服 GSI, PF-03084014 在 I 期或随后的 II 期研究中对纤维瘤均有良好疗效^[184]。其它一些 GSI 如 BMS-906024 (NCT01292655)、BMS-986115 (NCT01986218)、CB103 (NCT03422679)、LY3039478 (NCT02836600)、LY900009 (NCT01158404) 等已进入临床试验阶段,结果尚待验证。

(3) 针对 CSCs 微环境: CSCs 微环境有助于 CSCs 的自我更新和分化,并通过分泌因子和细胞接触的形式来调节 CSCs 的命运。C-X-C 基序趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 已在大多数癌症中被发现,特别是在 CSCs 中。最典型的 CXCR4 靶向药物是 plerixafor (AMD3100),该药物是一种用于多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 和非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 患者的有效造血干细胞动员剂^[185]。LY2510924 是一种小环肽,是 CXCR4 的一种有效的选择性拮抗剂,在 I 期试验中具有良好的耐受性,无严重不良事件^[186]。LY2510924 与其他治疗胶质瘤 (NCT03746080、NCT01977677 和 NCT01288573) 和多发性骨髓瘤 (NCT00103662、NCT0122 0375 和 NCT00903968) 的药物的联合也在临床试验中。

(4) 免疫疗法:基于对细胞免疫调控的认识,癌症治疗的新方法不断涌现。除了上述针对 CSCs 分子的抗体,一些新的抗 CSCs 免疫治疗方法,如免疫检查

点（immune checkpoint, IC）阻断或 CAR-T 细胞疗法，已经被开发出来。一些靶向免疫检查点受体的药物也已进入临床试验，比如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4）^[187]、程序性死亡受体 1（Programmed Cell Death 1, PD-1）^[188, 189]和程序性死亡受体-配体 1（Programmed Cell Death-Ligand 1, PD-L1）^[190-192]。对于 CAR-T 细胞治疗，一些靶点如 CD19、CD20、CD22、CD123、EpCAM 和 ALDH 已被用于 CSCs 定向免疫治疗。

1.4 本课题的目的和意义

乳腺癌是世界范围内发病率最高的癌症，威胁着全球女性的生命健康。临床上，治疗乳腺癌的手段正在不断更新和发展，但是对于转移性乳腺癌的患者，其生存率极低，属于无法治愈的状态。造成乳腺癌复发转移的一个重要原因是，乳腺癌是高度异质性的癌症，存在高度异质性的原因则是乳腺癌肿瘤干细胞的异质性。由于乳腺癌干细胞的无限增殖、多向分化及药物耐受的特性，使得它在肿瘤的发生发展、复发转移和耐药中发挥重要作用。然而，乳腺癌肿瘤干细胞是通过何种机制去发挥作用却是值得探究的。最新研究报道，LncRNA ST8SIA6-AS1 作为一种新发现的非编码 RNA，在多种癌症中异常表达，参与肿瘤细胞的增殖，迁移，凋亡等过程，但是 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌的表达情况以及其是否能够参与肿瘤干细胞的调控则是未可知的。因此，本文以肿瘤干细胞为研究切入点，明确 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌中的表达和预后情况，并探讨 ST8SIA6-AS1 是否可以影响肿瘤干细胞的干性维持状态；并在此基础上，进一步研究 ST8SIA6-AS1 调控乳腺癌肿瘤干细胞干性维持的分子机制，为基于肿瘤干细胞的治疗方案和靶向药物的开发提供理论和实验支持。

第 2 章 LncRNA ST8SIA6-AS1 正向调控 BCSCs 干性维持

2.1 前言

Long non-coding RNA (lncRNA), 含有超过 200 个核苷酸的长链非编码 RNA, 已被认为是癌症生物学中的新型调节因子^[193]。LncRNA 曾被认为是转录噪音, 但已被证明在各种恶性肿瘤类型的发展中具有关键作用^[194]。LncRNA 的异常表达通过转录或转录后的基因调控影响癌细胞的增殖、转移、自我更新和凋亡, 从而促进各种癌症类型的发展^[195, 196]。在这些 lncRNA 中, 有一个研究较少的 lncRNA ST8SIA6-AS1 (ST8SIA6 antisense RNA 1, ST8 α -N-乙酰-神经氨酸 α -2,8-丙二酰转移酶 6 反义 RNA1), 位于染色体 10p12.33, 已被确认为肝癌^[197-199]、垂体腺瘤^[200]、胆管癌^[201]、结肠癌^[202]的致癌基因。然而, ST8SIA6-AS1 是否与乳腺癌的发生发展有关, 缺乏报道; 其是否可以参与乳腺癌肿瘤干细胞干性调控更未可知。

肿瘤干细胞 (CSCs), 也称为肿瘤启动细胞, 被定义为具有自我更新、肿瘤启动和肿瘤维持能力的肿瘤细胞亚群。CSCs 已在白血病和包括乳腺癌在内的许多实体肿瘤中得到证实^[203]。此外, CSCs 被认为是肿瘤发生、发展、复发、转移和化疗耐药的“种子”^[204, 205]。因此, 研究 CSCs 特征的维持机制可能为乳腺癌的治疗提供新的策略。

微球体培养法 (或称悬浮培养法) 是实验室常用的富集肿瘤干细胞的方法, 即利用肿瘤干细胞的特性, 在无血清和非贴壁的条件下获得具有干性能力的细胞球体。目前已有众多文献报道, lncRNA 具有调控或维持 BCSCs 干性的能力, 调控机制也具有多样化, 比如, lnc030 通过稳定 SQLE mRNA 和增加胆固醇合成来维持 BCSCs 干性特征^[206]; lnc408 通过招募 SP3 抑制 CBY1 转录和增加核 β -catenin 水平维持 BCSCs 的干性^[207]; 低氧相关 lncRNA KB-1980E6.3 通过与 IGF2BP1 相互作用促进 c-Myc mRNA 的稳定性来维持 BCSCs 的干性^[208]; lncRNA LUCAT1/miR-5582-3p/TCF7L2 轴通过 Wnt/ β -catenin 途径调节乳腺癌干性^[209]; LncCCAT1 通过激活 WNT/ β -catenin 信号促进 BCSCs 的功能^[210]等, 为临床靶向乳腺癌肿瘤干细胞提供了大量的理论依据和实验数据支撑。

本论文前期进行了大量的文献调研和生物信息学的预测, 发现了 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌患者中的表达失调, 并猜想其可能具有调控 BCSCs 干性维持的能力, 本部分将探讨及验证这个猜想。

2.2 实验材料

2.2.1 细胞系

本章所涉及到的细胞系如表 2.1 所示。

表 2.1 细胞系信息

Table 2.1 Cell line information

细胞系名称	细胞系中文名称	来源
MCF10A	人正常乳腺细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
MCF7	人乳腺癌细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
SKBR3	人乳腺癌细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
MDA-MB-468	人乳腺癌细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
Hs578T	人乳腺癌细胞系	武汉普诺赛生物, 中国
HEK-293T	人胚肾细胞系	武汉普诺赛生物, 中国

2.2.2 主要试剂

本章所涉及到的试剂信息如表 2.2 所示。

表 2.2 试剂信息

Table 2.2 Reagent information

试剂名称	生存厂家	货号
DMEM 培养基	大连美仑, 中国	PWL035
RPMI1640 培养基	大连美仑, 中国	PWL034
DMEM/F12 培养基	大连美仑, 中国	PWL016
MCF10A 细胞专用培养基	武汉普诺赛, 中国	CM-0525
B27 细胞培养因子	Gibco 公司, 美国	12587010
碱性成纤维生长因子 (bFGF)	北京同立海源, 中国	GMP-TL401
表皮细胞生长因子 (EGF)	北京同立海源, 中国	GMP-TL613
二甲基亚砷 (DMSO)	北京索莱宝, 中国	D8371
兔抗人 Oct4 抗体	上海艾比玛特, 中国	T55781
兔抗人 Nanog 抗体	上海艾比玛特, 中国	T55611

兔抗人 Klf4 抗体	上海艾比玛特, 中国	T56648
兔抗人 Sox2 抗体	上海艾比玛特, 中国	T55268
兔抗人 c-Myc 抗体	上海艾比玛特, 中国	T55150
兔抗人 GAPDH 抗体	武汉艾伯泰克, 中国	A19056
青霉素/链霉素溶液	大连美仑, 中国	PWL062
胎牛血清 (FBS)	Gibco 公司, 美国	10099-141
无血清细胞冻存液	Biosharp 兰杰柯, 中国	BL203B
RIPA 裂解液 (强)	大连美仑, 中国	MA0151
蛋白酶抑制剂	大连美仑, 中国	MA0001
β -巯基乙醇	Sigma-Aldrich 公司, 美国	M6250
BCA 蛋白定量试剂盒	大连美仑, 中国	MA0082
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶, 中国	PG111/PG112 /PG113
甲醇	国药集团, 中国	67-56-1
脱脂奶粉	武汉塞维尔, 中国	G5002-100G
双色预染蛋白 Marker	上海雅酶, 中国	WJ102
PVDF 膜	Millipore 公司, 美国	32031613
十二烷基硫酸钠 (SDS)	北京索莱宝, 中国	S8010
三羟甲基氨基甲烷 (Tris base)	北京索莱宝, 中国	T8060
甘氨酸	北京索莱宝, 中国	G8200
TBST 缓冲液	大连美仑, 中国	MA0091
BSA	上海碧云天, 中国	ST025-100g
Meilunbio® 飞克特超敏 ECL 发光液	大连美仑, 中国	MA0186
TRZon Reagent	江苏康为世纪, 中国	CW0580S
超纯 RNA 提取试剂盒	江苏康为世纪, 中国	CW0581M
HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit	南京诺唯赞, 中国	R312-01
Hieff qPCR SYBR Green Master Mix	上海翊圣, 中国	11201ES03
DEPC 处理水 (无 DNA/RNA 酶)	大连美仑, 中国	MA0018
无水乙醇	国药集团, 中国	64-17-5
100bp DNA Ladder	南京诺唯赞, 中国	MD104-01/02
DL2000 Plus DNA Marker	南京诺唯赞, 中国	MD102-01/02

DL15000 DNA Marker	南京诺唯赞, 中国	MD103-01/02
Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2	南京诺唯赞, 中国	C214
ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit	南京诺唯赞, 中国	C115
2 × Phanta Flash Master Mix	南京诺唯赞, 中国	P510-01/02/03
AxyPrep PCR 凝胶回收试剂盒	Axygen 公司, 美国	AP-GX-250
AxyPrep PCR 清洁试剂盒	Axygen 公司, 美国	AP-PCR-250
胰蛋白胨	OXOID, 英国	LP0042
酵母提取物	OXOID, 英国	LP0021
琼脂粉	北京索莱宝, 中国	A8190
氨苄青霉素 (Amp) 溶液	北京索莱宝, 中国	A1170
嘌呤霉素	北京索莱宝, 中国	P8230
CCK-8 试剂盒	上海碧云天, 中国	C0038
4%多聚甲醛固定液	上海碧云天, 中国	P0099
无内毒素质粒中提试剂盒	江苏康为世纪, 中国	CW2105
EcoRI 内切酶	New England Biolabs, 美国	R3101S
BamHI 内切酶	New England Biolabs, 美国	R0136S
蛋白上样缓冲液	上海雅酶, 中国	LT103
吐温 20	大连美仑, 中国	MB2483
10 × NDA loading buffer	南京诺唯赞, 中国	P022-01
氯化钠	国药集团, 中国	7647-14-5
异丙醇	国药集团, 中国	67-63-0
氯仿	国药集团, 中国	8013-34-5
氢氧化钠	国药集团, 中国	1310-73-2
盐酸	国药集团, 中国	7647-01-0
慢病毒滴度试剂盒	北京博奥龙, 中国	BF06203
PEG8000	上海碧云天, 中国	ST483
甘油	大连美仑, 中国	MB2489
转染试剂 lipofectamine3000	Thermo Fisher 公司, 美国	L3000150
结晶紫染色液	上海碧云天, 中国	C0121
琼脂糖	大连美仑, 中国	MB2460

2.2.3 主要实验耗材

本章所涉及的耗材信息如表 2.3 所示

表 2.3 耗材信息

Table 2.3 Material information

耗材名称	生产厂家	货号/型号
25 cm ² /75 cm ² 细胞培养瓶	LabServe 公司, 美国	310109014/16
6/12/24/96 孔细胞培养板	LabServe 公司, 美国	310109005/6/7/8
超低吸附 6 孔板	Corning 公司, 美国	3471
35 mm/100 mm/150 mm 细胞培养皿	LabServe 公司, 美国	310109009/11/12
15 mL/50 mL 离心管	LabServe 公司, 美国	310109001/2
1.5 mL/2 mL 微量离心管	LabServe 公司, 美国	309101007/8
0.2 mL PCR Tubes	LabServe 公司, 美国	309101009
0.2 mL PCR 8 联管	LabServe 公司, 美国	309101010
细胞刮刀	LabServe 公司, 美国	08-100-24
细胞冻存管	Coring 公司, 美国	430659/430663
10 μ L/200 μ L/1 mL 吸头	Axygen 公司, 美国	T300/200/1000
滤纸	南京康洛达, 中国	TB-625412118234
封口膜	Parafilm 公司, 美国	AM-PM996
聚醚砜无菌滤器 (0.22 μ m)	Millipore 公司, 美国	MPGP002A1
聚醚砜无菌滤器 (0.45 μ m)	Millipore 公司, 美国	SLHP033RB
抗体孵育盒	武汉塞维尔, 中国	G6026

2.2.4 主要实验仪器与设备

本章所涉及的实验仪器与设备信息如表 2.4 所示

表 2.4 仪器与设备信息

Table 2.4 Instruments and equipment information

仪器耗材名称	生产厂家	货号/型号
--------	------	-------

超净工作台	苏州安泰, 中国	SW-CJ-2FD
生物安全柜	苏州安泰, 中国	BSC-1004
恒温细胞培养箱	上海一恒, 中国	BPN-150CW (UV)
低速离心机	Eppendorf 公司, 德国	5702
冷冻式高速离心机	Eppendorf 公司, 德国	5424
超速离心机	Beckman 公司, 美国	L-100XP
迷你离心机	大龙兴创, 中国	D1008
海尔-86°C 超低温冰箱	青岛海尔, 中国	W-86L490J
2-8°C 冷藏箱	青岛海尔, 中国	HYC-310S
冰箱	青岛海尔, 中国	BCD-216STPT
高压灭菌锅	ALP 公司, 日本	ALP CL-32L
微波炉	广东格兰仕, 中国	SRS-GF20
半微量天平	METTLER-TOLEDO 公 司, 瑞士	MS205DU/A
金属浴	北京大龙兴创, 中国	HB105-S2
液氮罐	青岛海尔, 中国	YDS-10-125
超纯水系统	Millipore 公司, 美国	Milli-Q® IQ 7000
摇床	上海拓赫机电, 中国	TS-X
蓝光切胶仪	上海拓赫机电, 中国	THBC-470
电热鼓风干燥箱	上海一恒, 中国	BPG-9140A
恒温水槽	上海一恒, 中国	DK-8D
超声波细胞破碎仪	上海沪析, 中国	JY96-IIN
凝胶成像系统	Bio-Rad 公司, 美国	ChemiDoc XRS
荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国	CFX96
PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国	C1000
水平电泳槽	Bio-Rad 公司, 美国	Mini-Sub Cell GT Cell
倒置荧光显微镜	Olympus 公司, 日本	CKX53
多功能酶标仪	Thermo Fisher 公司, 美 国	Thermo Varioskan LUX
蛋白转印系统	Bio-Rad 公司, 美国	Trans-Blot
制冰机	上海锦汶, 中国	ZB-25B
单道/8 道移液器	Eppendorf 公司, 德国	3120000/31220000
超声清洗机	山东博科, 中国	TH40-7800-01L
超微量分光光度计	Thermo Fisher 公司, 美 国	ND-ONE-W

2.2.5 质粒

本章所涉及的质粒信息如表 2.5 所示。ST8SIA6-AS1 原序列被插入质粒 pLVX-EF1A-Puro 中用于构建 ST8SIA6-AS1 的过表达质粒 pLVX-ST8SIA6-AS1。ST8SIA6-AS1 敲降质粒: pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#1, pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#2 和 pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#3 委托武汉擎科生物科技有限公司设计与构建, 敲降位点序列信息如表 2.6 所示。质粒 VSVG 和 GAG-POL 被用于慢病毒包装。质粒构建过程中使用的引物序列均委托武汉擎科生物科技有限公司合成。质粒载体的图谱如附录 4 中 1-4 所示。

表 2.5 质粒信息

Table 2.5 Plasmid information

质粒名称	来源
pLVX-EF1A-Puro	武汉科技大学生命科学与健康学院保存
pLKO.1-Puro	武汉科技大学生命科学与健康学院保存
GAG-POL	武汉科技大学生命科学与健康学院保存
VSVG	武汉科技大学生命科学与健康学院保存

表 2.6 ST8SIA6-AS1 敲降位点序列信息

Table 2.6 ST8SIA6-AS1 knockdown site sequence information

敲降质粒名称	敲降序列
pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#1	GAAGAGGAGACTTATGTTAC
pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#2	GAGTTCTGCTACAGAGAAGA
pLKO.1-sh-ST8SIA6-AS1#3	CAACCCTTGAATAGGGTTTG

2.2.6 主要试剂配制

(1) 人乳腺癌细胞株培养基: 500 mL DMEM 或 RPMI1640 培养基加入 5 mL 青霉素/链霉素溶液, 加入 50 mL FBS, 混匀后 4°C 密封保存。

(2) 乳腺癌肿瘤干细胞成球培养基: 50 mL DMEM/F12 培养基中, 加入 1 mL 2% B27、20 ng/mL bFGF (2 μ l)、20 ng/mL EGF (1 μ L), 4°C 保存, 1 周内尽快使用。

(3) 磷酸盐缓冲液 (1×PBS): 1 L 超纯水中加入 PBS 干粉, 超净工作台, 0.22 μ m 过滤分装, 4°C 密封保存。

(4) 细胞冻存液: 9 mL FBS 中加入 1 mL DMSO, 混匀, 现配现用。

(5) 胰蛋白酶消化液: 1 L PBS 溶液中, 加入 2.5 g 胰蛋白酶干粉, 加入 0.1 g EDTA, 混匀, 超净工作台中, 0.22 μm 过滤分装, 4°C 存放使用, -20°C 密封保存。

(6) LB 培养基: 1 L 超纯水中加入 10 g NaCl, 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 搅拌均匀, 121°C 灭菌 30 min 后, 4°C 密封保存。

(7) WB 电泳液: 1 L 超纯水中加入 3 g Tris Base, 18.8 g 甘氨酸, 1 g SDS, 搅拌均匀, 现配现用。

(8) WB 转膜液: 在 800 mL 超纯水中加入 5.8 g Tris Base, 2.9 g 甘氨酸, 搅拌均匀, 再加入 200 mL 甲醇, 4°C 冰箱放置 2 h 使用。

(9) 蛋白封闭液: 在 100 mL 的 TBST 溶液中加入 0.5 g 的脱脂奶粉或者 BSA, 剧烈摇晃, 使其充分溶解, 现配现用。

2.3 实验方法

2.3.1 细胞培养

本章所涉及到的细胞培养主要分为贴壁细胞培养和 Mammosphere 细胞培养: 其培养方式分别如下所述:

(1) 贴壁细胞培养

人正常乳腺组织细胞 MCF10A 使用 MCF10A 专用培养基培养 (购自武汉普诺赛生物有限公司); 人乳腺癌细胞系 MCF7 和 SKBR3 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 Hs578T 使用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基培养, 置于 37°C、5%CO₂ 无菌恒温培养箱中, 当细胞密度达到 80% 左右时进行传代培养: 吸弃原始培养基, PBS 溶液清洗细胞两遍, 加入胰蛋白酶消化液置于 37°C 无菌恒温培养箱中消化 3-5 min, 完全培养基终止消化, 吸置新的离心管, 300 g 离心 5 min, 弃上清, 使用新鲜培养基重悬, 用于后续操作。

(2) Mammosphere 细胞培养

细胞消化重悬后, 进行细胞计数, 使用康宁超低吸附 6 孔板并提供肿瘤干细胞成球培养基进行培养, 放置培养箱内, 每隔 3-4 天观察细胞成球情况, 传代时吸取细胞球体悬液至新的离心管, 室温静置 10 min, 尽可能的去除上清, PBS 清洗细胞沉淀, 静置 10 min, 小心吸弃上清, 加入适量胰蛋白酶溶液, 消化重悬后, 细胞计数, 继续培养, 每隔 3-4 天观察细胞成球情况。

2.3.2 细胞复苏与冻存

(1) 细胞复苏。从-80℃或液氮罐中迅速取出需要使用的细胞冻存管，立即放置 42℃水浴中，解冻过程中始终保持管帽高于水面，轻微摇晃至完全融化，迅速拿至离心机中进行低速离心。喷洒适量酒精，用无菌布擦净冻存管，放入超净工作台，小心吸弃上清液，加入 1 mL 完全培养基，轻轻吹打细胞，转入细胞培养皿中，并补加适量完全培养基，置入 CO₂ 培养箱中培养。

(2) 细胞冻存。同细胞传代，当细胞密度达到 80%-90%时，此时细胞处于对数生长期，状态较好，开始冻存。首先丢弃原始培养基，使用预冷的 PBS 溶液清洗待冻存的细胞两遍，随后使用胰蛋白酶消化液进行消化，3-5 min 终止细胞消化，轻轻吹打细胞，转移至 EP 管中离心去上清，使用现配的细胞冻存液或无血清细胞冻存液对细胞进行重悬，分装至细胞冻存管中，最后放入细胞冻存盒中置于-80℃冰箱过夜，24 h 后转移至液氮罐中长期保存。

2.3.3 质粒构建与提取

(1) 质粒构建：本章所涉及到的质粒构建的方法均由同源重组的方法完成。质粒构建可分为以下 4 个步骤：①线性目的基因片段的获取；②线性质粒载体的获取；③同源重组；④转化大肠杆菌及测序验证。详细步骤如下：

①线性目的基因片段的获取：对于 ST8SIA6-AS1 的过表达质粒 pLVX-ST8SIA6-AS1，通过 NCBI 数据库获得其序列，使用 SnapGene 软件设计引物序列，以基因组为模板，配制 PCR 反应体系。PCR 引物信息如表 2.7 所示，PCR 反应体系信息如表 2.8 所示。将配制完成的 PCR 反应体系放入 PCR 仪进行扩增获得目的片段。PCR 反应程序如表 2.9 所示。得到上述目的片段后，使用 PCR 清洗试剂盒进行片段清洗，然后直接以此溶液为模板，加入带有同源臂的引物继续进行 PCR 反应，同源臂扩增引物如表 2.7 所示，其 PCR 反应体系和反应程序同上，获得线性带同源臂的目的基因片段。

表 2.7 质粒构建引物序列信息

Table 2.7 Primer information for plasmid construction

引物名称	序列 (5'引物至 3')
ST8SIA6-AS1	F: GAGAAGGGAGGAGTTATTCA
	R: TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCATGTATATAACTGAC

引物名称	序列 (5'引物至 3')
pLVX-ST8SIA6-AS1	F:
	GATCTATTTCCGGTGAATTCGAGAAGGGAGGAGTTATTC
	A
	R:
	GGGATCCGCGGCCGCTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTGC
	ATGTATATAACTGAC

表 2.8 PCR 反应体系表

Table 2.8 PCR reaction system

成分	用量
2 × Phanta 预混液	25 μL
模板 DNA	100-200 ng 基因组或 20 ng-40 ng 质粒或 2-4 μL cDNA
上游引物 (10 μmol / L)	2 μL
下游引物 (10 μmol / L)	2 μL
去离子水	补足至 50 μL

表 2.9 PCR 反应程序

Table 2.9 PCR procedure

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	4 min	30
变性	95°C	15 sec	
退火	56°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec / kb	
彻底延伸	72°C	5 min	

②线性质粒载体的获取：在 pLVX-EF1A-Puro 空载上选择合适酶切位点，配制相应酶切反应体系，反应体系如表 2.10 所示。将配制完成的酶切反应混合液放置在 37°C 恒温培养箱中孵育 3 h，使用 PCR 清洗试剂盒回收反应产物，便可获得线性质粒载体片段，用于后续反应。

表 2.10 核酸内切酶消化体系表

Table 2.10 Nucleic acid endonuclease reaction system table

成分	用量
质粒 DNA	5-8 μg
核酸内切酶	30 酶活单位 (U)
10 $\times$ Cutsmart 缓冲液	5 μL
去离子水	补足至 50 μL

③同源重组：在同时获得线性目的基因片段和线性质粒载体后，根据同源重组试剂盒（ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit）的方法说明，配制同源重组反应混合液进行同源重组反应，反应体系如表 2.11 所示。

表 2.11 同源重组连接体系

Table 2.9 homologous recombination linkage system

组分	用量
线性质粒载体	载体质粒碱基对数 $\times$ 0.02 ng
线性目的片段	插入片段碱基对数 $\times$ 0.04 ng
2 $\times$ ClonExpress Mix	10 μL
去离子水	补足至 20 μL

④转化大肠杆菌及测序验证：获得上述连接产物后，从-80℃冰箱拿出大肠杆菌感受态细胞，置于冰上解冻后，在超净工作台中加入适量连接产物，冰上静置 10 min，然后 42℃水浴中热激 60 sec 后立刻置于冰上冷却 5 min，在带目的抗性的 LB 平板中，均匀涂布转化后的感受态细胞，在 37℃恒温培养箱中倒置培养过夜，第二天观察菌落生存状态。随机挑选多个单克隆菌落，接种至含目的抗性的 LB 培养液中，在 37℃恒温摇床中培养 6 h，送至武汉擎科生物技术有限公司进行菌液测序验证。测序正确的菌液将直接用于后续质粒提取和保存。

（2）质粒提取：使用上述测序正确的单克隆菌液，扩大培养至 200 mL LB 培养液中，扩增培养结束后，使用无内毒素质粒中提试剂盒（康为世纪 CW2105S）进行质粒提取，详细步骤如下：取 10 mL 菌液，在低速离心机中 3000 g 室温离心 15 min，尽量弃尽上清来获取细菌沉淀；先加入 500 μL Buffer P1（已加入 RNase A），涡旋振荡 30 sec；再加入 500 μL Buffer P2，上下温和颠倒 8 次左右，让菌体裂解充分，室温放置 3 min；最后加入 500 μL Buffer E3，立刻上下颠倒混匀，

室温放置 3 min；在冷冻离心机中以 6000 g 4℃离心 4 min；吸取上清到过滤柱（Endo-Remover FM）中（已经装入收集管），11000 g 在 4℃冷冻离心 1 min；转移滤液到新的 EP 管中，加入 450 μ L 异丙醇，上下颠倒混匀；在吸附柱（Spin Columns DL）中提前装入收集管，加入 200 μ L Buffer PS，11000 g 离心 2 min；将上一步骤中滤液与异丙醇的混合液加入吸附柱中，11000 g 在 4℃离心 30 sec；向吸附柱中加入 750 μ L Buffer PW（提前加入无水乙醇），11000 g 在 4℃离心 1 min，再次 11000 g 离心 2 min；将吸附柱置于新的 EP 管中，在吸附膜的中部加入 150 μ L Endo-Free Buffer EB，室温放置 3 min 后 11000 g 室温离心 2 min 得到质粒溶液。

2.3.4 细胞转染

细胞的转染主要包括以下步骤：①准备细胞；②配制转染混合液；③转染及换液。详细步骤如下：

①准备细胞：在转染前一天进行细胞传代，去除细胞上清后，用胰蛋白酶溶液消化处理细胞，加入完全培养基中止，用移液器吹打细胞悬液至其均匀，进行细胞计数后，将细胞悬液配制到所需的浓度，并将细胞转移至相应培养容器中，使其转染时细胞密度合适即可。

②配制转染混合液：提前准备两个 1.5 mL 的无菌 EP 管，A 管中加入适量待转染质粒并使用 100 μ L 无血清培养基混合均匀，B 管中加入适量转染试剂如 Lipofectamine 3000 或 PEI 并同样使用 100 μ L 无血清培养基混合均匀，室温静置 3 min 后，将两管溶液混合均匀，此刻得到转染混合液，室温静置 30 min。

③转染及换液：将配制好的转染混合液加入到目的细胞中，置于 CO₂ 培养箱中培养，24 h 后弃掉培养液，更换新的完全培养基后，置于细胞培养箱继续培养用于后续实验。

2.3.5 慢病毒包装与侵染

本章所涉及的慢病毒包装系统为第二代 3 质粒包装系统，主要包括以下步骤：①准备细胞；②配制慢病毒转染混合液；③转染与换液；④病毒浓缩；⑤慢病毒侵染。详细步骤如下：

①准备细胞：将冻存的 293T 细胞进行复苏，将细胞放置在 37℃恒温培养箱中扩增 2 代以上可用于转染。当 293T 细胞密度到 80%-90%左右时，准备转染。

②配制慢病毒转染混合液：提前准备两个无菌 EP 管内，按照目的质粒：VSVG：GAG=4:3:1 的比例加入三个质粒于 A 管内并加入 250 μ L 无血清培养基

混匀（总质量为 12 μg ）；按照转染质粒与转染试剂 PEI 等于 1:3 的比例取 36 μL PEI 于 B 管内并加入 250 μL 无血清培养基混匀；两管室温静置孵育 5 min 后，取 B 管溶液加入 A 管内吹打混匀，转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 15-25 min。

③转染与换液：将孵育结束的慢病毒转染混合液小心加入到 293T 细胞中，轻微摇晃培养皿，放回细胞培养箱中继续培养；在转染 6-8 h 后弃掉所有培养基，换成新鲜的完全培养基，继续放回细胞培养箱培养。

④病毒浓缩：转染 72 h 后，收集所有细胞上清液于 50 mL 离心管中，在冷冻离心机中以 3000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min，去除大部分细胞碎片后，使用 0.45 μm 聚醚砜膜过滤器过滤，得到慢病毒原液；将慢病毒原液与慢病毒浓缩试剂 PEG8000 按规定比例混合均匀，每 30 min 对此混合液进行颠倒混匀操作，操作 4 次后，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置过夜；在冷冻离心机中以 6000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min，尽可能去除所有上清，得到慢病毒沉淀，使用适量 PBS 溶液或者无血清细胞培养基进行重悬，得到慢病毒浓缩液，取少量慢病毒原液进行病毒滴度分析。

⑤慢病毒侵染：测定慢病毒滴度后，以适合的 MOI 将慢病毒浓缩液加入到待侵染的细胞中，轻微摇晃 6 孔板，使其混合均匀；侵染 24 h 后，去除原培养基，PBS 溶液清洗 2 遍，更换新鲜的完全培养基，继续培养用于后续操作。

2.3.6 慢病毒滴度分析

慢病毒滴度分析所采用的方法是 P24 ELISA 法，通过检测慢病毒外壳中的 P24 蛋白的含量，来确定慢病毒滴度的水平。本章使用的试剂盒为北京博奥龙免疫技术有限公司的慢病毒滴度检测试剂盒 BF06203。详细步骤如下：

- （1）按要求将待测样品和对照品稀释成不同浓度梯度。
- （2）在反应孔中先加入裂解液，再加入待测样品和对照品，然后按步骤依次加入酶结合物，底物，终止液，孵育时间均为 1 h。
- （3）使用酶标仪读取数值，波长为 450 nm。
- （4）绘制标准曲线，并计数待测样品的滴度值。
- （5）滴度计算注意事项：1 ng P24 $\approx 1.25 \times 10^7$ LPs。每 100-1000 LPs 中含有一个具有感染活性的慢病毒颗粒，即 1 TU。

2.3.7 qRT-PCR 实验

（1）RNA 提取：本章中所涉及到的 RNA 提取为细胞总 RNA 提取，使用到的试剂盒为超纯 RNA 提取试剂盒（康为世纪），详细步骤如下：收集细胞，使其数量为 $3-6 \times 10^6$ 个，300 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min，在细胞沉淀中加入 1 mL TRIzol 试剂，

反复吹打几次，使细胞裂解充分；加入 200 μL 氯仿，涡旋剧烈震荡 30 sec，14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min，取上层水相中的无色液体，加入等体积 70%乙醇混匀，加入到吸附柱（Spin Columns RM）中，置于收集管内，14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 sec，丢弃废液，加入 700 μL Buffer RW1，14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 sec 后丢弃废液，加入 500 μL Buffer RW2（提前加入无水乙醇），14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 sec 后丢弃废液，重复上一步骤，14000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 min 后丢弃废液，将吸附柱置于一个新的无 RNase 的 EP 管中，室温静置 10 min，在吸附柱的中部加入 30 μL RNase-Free Water，室温静置 3 min，14000 g 离心 1 min 后，获取 RNA 溶液，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

（2）cDNA 制备：本章中所涉及到的 cDNA 制备所用到的试剂盒为 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR Kit（诺唯赞）试剂盒，详细步骤如下：去除基因组 DNA，需在 RNase-free 的 EP 管中配制如下反应体系，反应体系如表 2.12 所示。混合液体系配制完成后，置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 中反应 2 min。配制逆转录反应体系，可直接在上一步骤中的反应管中加入 5 x HiScript II qRT SuperMix II，如表 2.13 所示。然后进行逆转录反应，其反应过程条件如表 2.14。获得的产物可立即用于后续 qPCR 反应。

表 2.12 基因组 DNA 去除体系

Table 2.12 Genomic DNA removal system

成分	用量
RNase-free ddH ₂ O	补足至 16 μL
总 RNA	1 μg
4 x gDNA wiper 混合液	4 μL

表 2.13 cDNA 第一链合成体系

Table 2.13 cDNA first strand synthesis system

成分	用量
上一步的混合液	16 μL
5 x HiScript II qRT SuperMix II	4 μL

表 2.14 逆转录反应程序

Table 2.14 Reverse transcription reaction procedure

温度	时间
50 °C	15 min
85 °C	5 sec

(3) 实时荧光定量 PCR 分析：首先根据所需检测的目的基因，通过 NCBI 获取基因序列，使用引物设计软件进行 qPCR 引物设计，使用 NCBI Blast 对引物的特异性进行检测。本章所使用到的引物序列如下表 2.15 所示：

表 2.15 qPCR 引物序列信息

Table 2.15 qPCR primer sequence information

基因名称	引物序列 (5'引物至 3')
ST8SIA6-AS1	F: CCATCCATCATGGCCAAAGC
	R: CAGGGTTTCTTCGGTCGTCA
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
Nanog	F: ACTCTTCCTACCACCAGGGATGC
	R: CTCCAGGACTGGATGTTCTGGGTC
Oct4	F: TTTTGGTACCCCAGGCTATGGGAG
	R: GTTTGAATGCATGGGAGAGCCCAG
c-Myc	F: GGCTCCTGGCAAAAGGTCA
	R: CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
Klf4	F: AAGGTCAGTCCCGGGGATTTGTAG
	R: GAGCTCTAGGGGTGAAGAAGGTGG
Sox2	F: AGCTACAGCATGATGCAGGACCAG
	R: CGTTCATGTAGGTCTGCGAGCTG

采用 SYBR Green 法进行 qPCR 分析，本章中所使用到的试剂盒为 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒（翊圣），具体步骤是，以 cDNA 样本为模板，加入特异性 qPCR 引物进行反应，其反应体系表 2.16 如下所示。在 PCR 管中配制反应体系完成后，置于 qRT-PCR 仪中进行反应，其反应程序如表 2.17 所示。

表 2.16 qRT-PCR 体系表

Table 2.16 qRT-PCR reaction system

成分	用量
去离子水	补足至 20 μL
Hieff qPCR SYBR 预混液	10 μL
qRT-PCR 上游引物 (10 μM)	1 μL
qRT-PCR 下游引物 (10 μM)	1 μL
cDNA	1 μL (去离子水稀释 3 倍)

表 2.17 qRT-PCR 反应程序表

Table 2.17 qRT-PCR reaction procedure

循环步骤	温度	时间	循环数	读取荧光值
预变性	95°C	5 min		
变性	95°C	10 sec	40	否
退火	60°C	20 sec		否
延伸	72°C	20 sec		是
溶解曲线	65-95°C 每 0.5°C 升温	5 sec		是

程序完成后, 用 BioRad CFX Manager 软件对数据进行分析, 并用内参基因进行半定量。检测编码基因的表达时用 GAPDH 作为内参基因。

2.3.8 蛋白质免疫印迹分析

(1) 蛋白质提取: 对于细胞收集, 去除细胞培养皿中的上清后, 用胰酶处理细胞, 用适量完全培养基中止消化, 收集细胞悬液到 1.5 mL EP 管, 300 g 离心 5 min 去除上清, 用 PBS 缓冲液清洗 1 次后, 300 g 离心 5 min 去除上清, 获得细胞沉淀; 提前将 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂混匀后, 适量加入含有细胞沉淀的 EP 管中, 吹匀后置于冰上裂解 20 min; 随后在细胞超声裂解仪下间断超声多次, 每次 5 sec, 直至溶液澄清稀薄; 超声结束后将 EP 管置于冰上静置 10 min 后, 预冷离心机 11000 g 4°C 离心 15 min; 转移上清至洁净 4°C 预冷的 1.5 mL EP 管, 用 BCA 定量试剂盒 (美仑) 根据厂家说明对 EP 管中的蛋白溶液定量。用 5×loading Buffer 配制成 100 μL 的 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白质溶液后 100°C 金属浴 10 min。

(2) 制备聚丙烯酰胺凝胶: 使用雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒按厂家说明制备相应浓度的聚丙烯酰胺凝胶, 并配制 SDS-电泳液。

(3) 电泳：待凝固后转移至电泳槽，向电泳槽添加电泳液直至没过凝胶的加样孔。拔出梳子添加样品及 marker，正确组装电极，在 150V 的工作电压下恒压运行至溴酚蓝指示带到达低端，停止运行。

(4) 转膜：采用湿转法。配制相应体积的转膜液并加入对应体积的甲醇置于 4℃预冷。将 PVDF 膜置于甲醇中活化 3 min。在缓冲液体系中，将转印夹从正极到负极以海绵-滤纸-PVDF 膜-聚丙烯酰胺凝胶-滤纸-海绵正确组装。将转印夹转移至转膜槽，加入预冷的转膜液。以 200 mA 稳定运行相应时间。

(5) 封闭：转膜结束后，将 PVDF 膜放入装有 5%的脱脂奶粉溶液的容器内在摇床上孵育 1 h。

(6) 抗体孵育：封闭结束后用 1×TBST 缓冲液润洗 PVDF 膜一次，随后将 PVDF 膜用杂交带包裹孵育相应一抗 4℃过夜。孵育结束后，将 PVDF 膜转移至孵育盒，用 1×TBST 缓冲液在摇床上清洗 PVDF 膜 4 次，每次 5 min。随后用相应的二抗室温孵育 1 h。取出 PVDF 膜用 1×TBST 缓冲液在摇床上清洗 4 次，每次 5 min。WB 第一抗体信息如表 2.18 所示，WB 第二抗体信息如表 2.19 所示。

表 2.18 WB 第一抗体信息

Table 2.18 WB Primary Antibody Information

名称	品牌	货号	WB 实际条带大小 (kDa)
Nanog	Abmart	T55611	37
Oct4	Abmart	T55781	45
Sox2	Abmart	T55268	34
c-Myc	Abmart	T55150	57
Klf4	Abmart	T55648	54
GAPDH	Abclonal	AC033	36

表 2.19 WB 第二抗体信息

Table 2.19 WB Secondary Antibody Information

名称	品牌	货号
HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Abclonal	AS014
HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Abclonal	AS003

(7) 显影：用 ECL 显色液的 A 液和 B 液等体积混合，配制 ECL 显色液。

吸取少量显色液覆于 PVDF 膜上孵育 2 min 后置于暗室曝光成像。

2.3.9 细胞活力分析

去除培养在细胞培养皿的上清后，用胰酶处理并收集获得细胞悬液，用适量完全培养基中止消化，300 g 离心 5 min 去除上清，用完全培养基重悬细胞后计数。

通过 CCK8 试剂盒测定细胞增殖速率。将 1000 / 100 μ L 细胞在 96 孔板中以 5 次重复在 CO₂ 培养箱中预培养 24 小时。然后在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 分别更换为含有 10% CCK8 溶液的完全培养基。孵育 2 h 后测定 450 nm 处的吸光度。

2.3.10 细胞迁移分析

(1) 采用对数生长期的细胞，去除细胞上清，用胰酶消化处理，用适量完全培养基中止消化，300 g 离心 5 min 去除上清，用无血清培养基重悬细胞后进行计数。

(2) 取 200 μ L 细胞悬液，使其细胞总数为 5000 个且混匀，置于 8 μ m 滤膜直径的 Transwell 小室的上室。小室的下室加入 600 μ L 含 20% 血清的完全培养基。将 Transwell 小室放入 CO₂ 培养箱培养 24 h。

(3) 培养结束后，去除 Transwell 小室上室和下室的培养基，用 PBS 溶液润洗 2 次，

(4) 将小室取出置于 4% 的多聚甲醛固定液中固定 20 min。

(5) 固定结束后，去除固定液，加入 0.1% 的结晶紫染液于下室染色 15 min。

(6) 染色结束后，除去结晶紫染液，用棉签擦拭 Transwell 小室的上室，擦去上室的结晶紫染液，用 PBS 缓冲液清洗 3 次。

(7) 待小室自然干燥后，在倒置显微镜下 (200X) 对 Transwell 小室的下室成像。每个样本取 6 个视野成像。

2.3.11 细胞克隆形成

(1) 采用对数生长期的细胞，首先去除培养在 6 孔板中的细胞上清液后，PBS 溶液清洗两遍，再用胰酶消化处理，用适量完全培养基中止消化，300 g 室温离心 5 min 去除上清，用完全培养基重悬细胞后计数。

(2) 取 2 mL 混匀的细胞悬液，使其含 1000 个细胞接种至 6 孔板中。将 6 孔板置于 CO₂ 培养箱中培养 10 天，每 3 天更换一次培养基。

(3) 培养结束后, 去除 6 孔板的上清, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 加入 1 mL 的 4%多聚甲醛固定液, 固定细胞 20 min。

(4) 固定结束后, 去除固定液, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 加入 0.1%的结晶紫染液对固定后的细胞进行染色 15 min。

(5) 染色结束后, 去除结晶紫染液, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 至 6 孔板空白背景无明显结晶紫染液附着, 用相机对 6 孔板成像。

2.3.12 生物信息学分析

通过使用在线生物信息学分析网站及工具分析 TCGA 数据库中 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌患者中表达及在乳腺癌患者中的预后情况。具体使用的网站及工具有: 仙桃学术 (<https://www.xiantao.love/>) 和 Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>)。

2.3.13 数据统计

统计分析数据的结果用平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SD) 来呈现。两组数据之间用 t 检验分析组间差异。多组数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 然后进行 Tukey 检验, 比较组间差异。采用 GraphPad Prism 软件进行数据统计分析并导出图表。*代表 $p<0.05$, 表示数据有显著性差异; **代表 $p<0.01$ 表示数据有极显著的差异。

2.4 结果

2.4.1 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌中高表达且与预后不良相关

之前的众多文献报道中, 已经证实了 ST8SIA6-AS1 与癌症的发生发展存在密切联系, 且大多数是与肝癌相关。但是, ST8SIA6-AS1 在乳腺癌的表达与其预后情况都还未曾报道。本章, 通过生物信息学在线分析工具(仙桃学术)对 TCGA 数据库中乳腺癌 (Breast invasive carcinoma, BRCA) 患者的 ST8SIA6-AS1 的表达谱进行了分析, 其中乳腺癌组织的样本数是 1109 例, 癌旁组织的样本数是 113 例。结果如图 2.1 A 所示, 与 113 例癌旁组织相比, ST8SIA6-AS1 在 1109 例 BRCA 患者中表达显著上升。如图 2.1 B 所示, 联合 TCGA 数据库的癌旁组织样本数与 GTEx 数据库中的正常样本组织数后, 与 292 例正常样本相比, ST8SIA6-AS1 在 1109 例 BRCA 患者中表达依然是显著升高的。同样的, 在 TCGA 数据库中, 能

够匹配到癌旁组织的样本数有 112 例，ST8SIA6-AS1 在这 112 例具有匹配癌旁组织样本的 BRCA 患者中表达同样是显著升高的，如图 2.1 C 所示。为了确定 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌患者中的预后价值，Kaplan-Meier Plotter 在线工具被用来分析 TCGA 数据库中 ST8SIA6-AS1 的表达与乳腺癌患者总体生存率（OS）、无病生存率（DFS）、无远处转移的生存率（DMFS）的关系，其中乳腺癌的高低表达参数设置按网站默认参数即可。如图 2.1 D-F 所示，与 ST8SIA6-AS1 低表达组相比，ST8SIA6-AS1 高表达组的乳腺癌患者的 OS ($P=0.0069$)、DFS ($P=4.1E-07$) 和 DMFS ($P=0.00023$) 都显著更低。

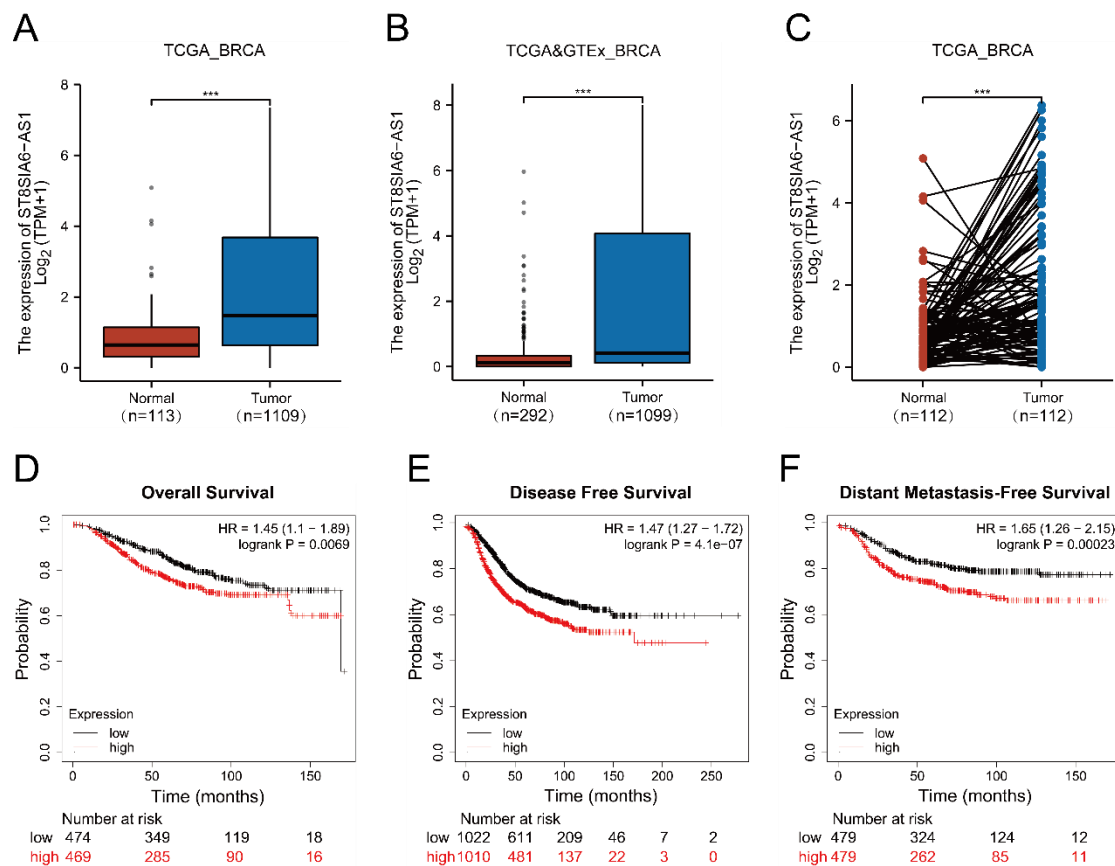


图 2.1 ST8SIA6-AS1 在 BRCA 患者中表达升高且与预后不良相关

A. TCGA_BRCA 数据库中 ST8SIA6-AS1 的表达水平；**B.** TCGA_BRCA & GTEx 联合数据库中 ST8SIA6-AS1 的表达水平；**C.** TCGA_BRCA 数据库中配对患者中 ST8SIA6-AS1 的表达水平；**D-F.** Kaplan-Meier Plotter 在线工具绘制 TCGA 数据库中 ST8SIA6-AS1 表达与 BRCA 患者 OS、DFS、DMFS 的关系。

Figure 2.1 ST8SIA6-AS1 expression is elevated in BRCA patients and is associated with poor prognosis

A. Expression levels of ST8SIA6-AS1 in the TCGA_BRCA database; B. Expression levels of ST8SIA6-AS1 in the combined TCGA_BRCA & GTEx database; C. Expression levels of ST8SIA6-AS1 in paired patients in the TCGA_BRCA database; D-F. Kaplan-Meier Plotter online tool to plot the relationship between ST8SIA6-AS1 expression in the TCGA database and OS, DFS, and DMFS in BRCA patients.

为了验证 ST8SIA6-AS1 是否在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中高表达,通过 qRT-PCR 分析了 ST8SIA6-AS1 在不同人乳腺癌细胞系中 mRNA 的表达水平,使用到的细胞系有:人正常乳腺组织细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞系 SKBR3、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 与 Hs578T。结果如图 2.2 A 所示,与正常的人乳腺组织细胞 MCF10A 相比,除了人乳腺癌细胞系 MCF7 和 MDA-MB-468 表达没有显著变化以外,其余的人乳腺癌细胞系中 ST8SIA6-AS1 的 mRNA 表达水平都发生了不同程度的上升,包括 SKBR3、MDA-MB-231 和 Hs578T;其中人乳腺癌细胞系 SKBR3 和 Hs578T 的升高倍数更显著。因此,人乳腺癌细胞系 SKBR3 和 Hs578T 被用于开展后续实验。在接下来的乳腺癌干细胞富集实验结果中,与原代贴壁细胞相比,SKBR3 和 Hs578T 获得的悬浮干细胞球体中 ST8SIA6-AS1 的 mRNA 表达水平也发生了显著的上调,如图 2.2 B 所示。

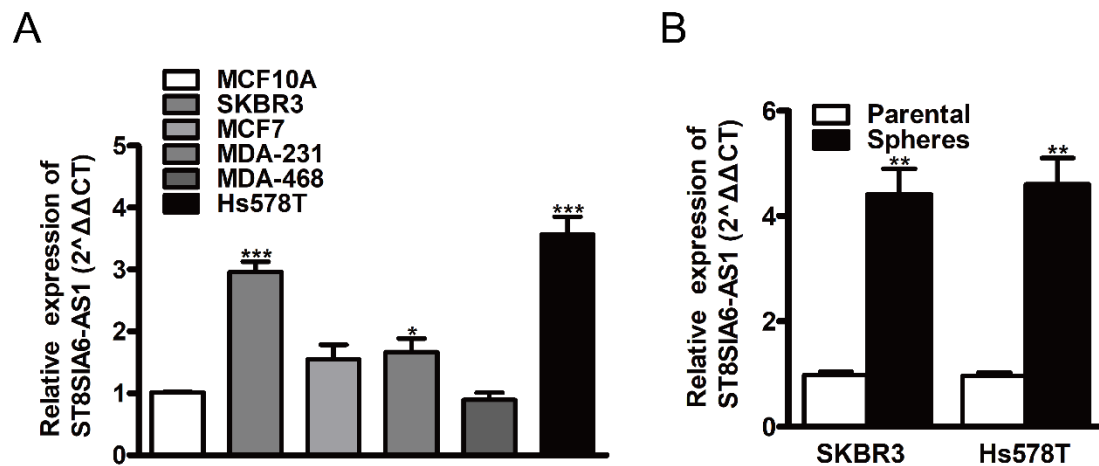


图 2.2 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中表达升高

A. ST8SIA6-AS1 在乳腺癌细胞系的表达水平; B. ST8SIA6-AS1 在 SKBR3 和 Hs578T 的肿瘤干细胞的表达水平

Figure 2.2 Elevated expression of ST8SIA6-AS1 in breast cancer cell lines

A. Expression level of ST8SIA6-AS1 in breast cancer cell lines; B. Expression level of ST8SIA6-

2.4.2 敲低 ST8SIA6-AS1 的表达抑制 BCSCs 干性

通过慢病毒包装技术对乳腺癌细胞系中 ST8SIA6-AS1 的表达进行稳定敲低,按照 shRNA 慢病毒敲低技术的实验步骤,构建了 3 个不同敲低靶点的 shRNA 慢病毒包装质粒,通过与慢病毒辅助质粒共用在 HEK-293T 细胞系产生活性慢病毒颗粒后,侵染人乳腺癌细胞系 SKBR3 和 Hs578T。构建成功的细胞系有: SKBR3-shNC、SKBR3-shST8SIA6-AS1#1、SKBR3-shST8SIA6-AS1#2、SKBR3-shST8SIA6-AS1#3 和 Hs578T-shNC、Hs578T-shST8SIA6-AS1#1、Hs578T-shST8SIA6-AS1#2、Hs578T-shST8SIA6-AS1#3。结果如图 2.3 A 所示, shRNA#2 的敲低效果优于 shRNA#1 和 shRNA#3,因此后续实验将使用 shRNA#2 慢病毒侵染并筛选后的细胞系。首先,通过 CCK-8 细胞活力检测实验分析了 ST8SIA6-AS1 敲低后 SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力。如图 2.3 B-C 所示,在 48 h, 72 h, 96 h 时,相较于对照组,敲低 ST8SIA6-AS1 后的 SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力都有所下降。此外,敲低 ST8SIA6-AS1 后的 SKBR3 和 Hs578T 的细胞迁移能力显著下降(图 2.3 D-E)。

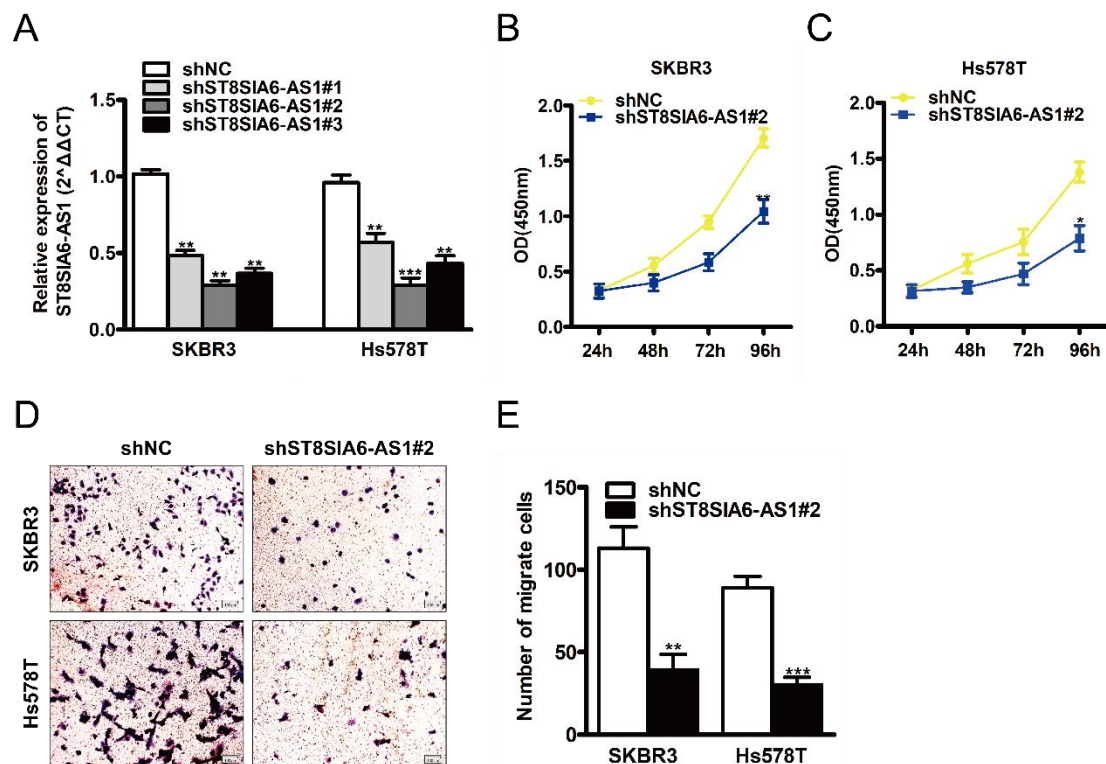


图 2.3 敲低 ST8SIA6-AS1 抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移

A. qRT-PCR 验证 ST8SIA6-AS1 的敲低效率; B. ST8SIA6-AS1 敲低后 SKBR3 细胞活力检测; C. ST8SIA6-AS1 敲低后 Hs578T 细胞活力检测; D-E. ST8SIA6-AS1 敲低后细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 2.3 Knockdown of ST8SIA6-AS1 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells

A. qRT-PCR to verify the knockdown efficiency of ST8SIA6-AS1; B. SKBR3 cell viability assay after ST8SIA6-AS1 knockdown; C. Detection of Hs578T cell viability after ST8SIA6-AS1 knockdown; D-E. Detection and quantification of cell migration ability after ST8SIA6-AS1 knockdown.

为了验证 ST8SIA6-AS1 表达的降低是否会影响乳腺癌细胞系的干性维持的能力, 本文检测了多能干性转录因子 c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的表达情况。结果如图 2.4 A-B 所示, 敲低 ST8SIA6-AS1 后, c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的 mRNA 表达水平发生了显著的降低, 其蛋白表达也同样的发生了显著下调 (2.4 C)。通过悬浮干细胞球体实验发现, 敲低 ST8SIA6-AS1 后, SKBR3 和 Hs578T 的细胞成球大小和数量减少 (图 2.4D-E)。同时, 为了验证敲低 ST8SIA6-AS1 后, 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力的变化, CCK-8 实验也被用于此处。结果如图 2.4F-G 所示, 在随着紫杉醇和多柔比星的浓度的上升后, 细胞的活力也随之降低, 这表明细胞对其的抵抗力也在下降。分别来看, 细胞对紫杉醇更敏感, 抵抗力更低, 当浓度达到 50 ng/mL 时, 细胞已出现显著的活力下降, 在浓度达到 100 ng/mL 和 200 ng/mL 时, 其活力下降更严重更显著; 相对于细胞对紫杉醇的高敏感性, 细胞对多柔比星的敏感性稍微减低, 当多柔比星的浓度处于 100 nM 时, 实验组与对照组之间细胞活力没有发生显著变化, 当药物浓度达到 300 nM 时, 细胞活力才发生显著下降, 当药物浓度达到 600 nM 时, 细胞活力也发生降低, 但是下降程度都较低。最后, 细胞克隆形成的数量也发生了大幅度减少 (图 2.4 H-I)。

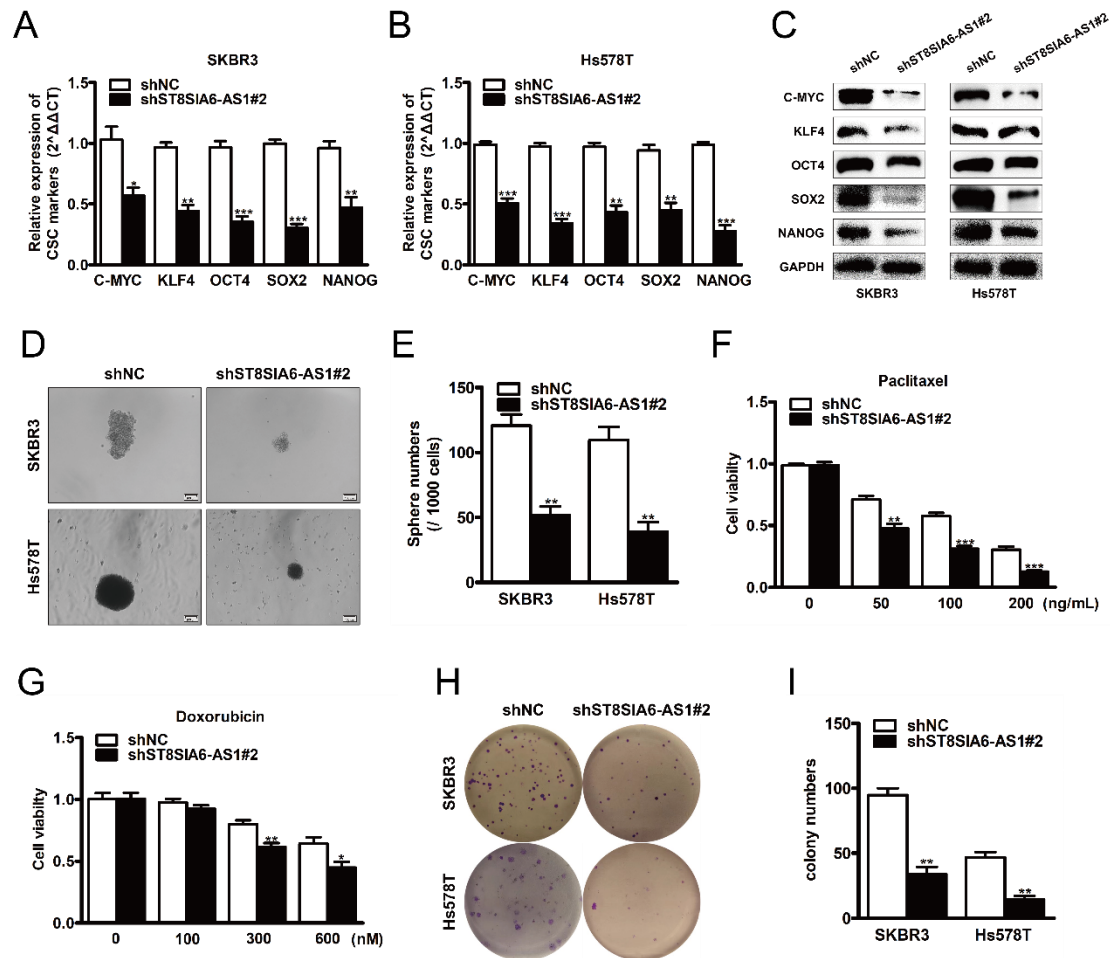


图 2.4 敲低 ST8SIA6-AS1 抑制 BCSCs 的干性维持

A. ST8SIA6-AS1 敲低后 SKBR3 细胞中干性标志物 mRNA 表达水平的检测；**B.** ST8SIA6-AS1 敲低后 Hs578T 细胞中干性标志物 mRNA 表达水平的检测；**C.** ST8SIA6-AS1 敲低后细胞中干性标志物蛋白表达水平的检测；**D-E.** ST8SIA6-AS1 敲低后干细胞悬浮球体形成能力的检测；**F-G.** ST8SIA6-AS1 敲低后 SKBR3 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力检测；**H-I.** ST8SIA6-AS1 敲低后细胞克隆形成能力的检测。

Figure 2.4 Knockdown of ST8SIA6-AS1 inhibits stemness maintenance of BCSCs

A. Detection of stemness marker mRNA expression levels in SKBR3 cells after ST8SIA6-AS1 knockdown; **B.** Detection of stemness marker mRNA expression levels in Hs578T cells after ST8SIA6-AS1 knockdown; **C.** Detection of stemness marker protein expression levels in cells after ST8SIA6-AS1 knockdown; **D-E.** Assay of stem cell suspension sphere formation ability after ST8SIA6-AS1 knockdown; **F-G.** Assay of resistance to paclitaxel and doxorubicin in SKBR3 cells after ST8SIA6-AS1 knockdown; **H-I.** Assay of cell clonogenic ability after ST8SIA6-AS1 knockdown.

2.4.3 过表达 ST8SIA6-AS1 促进 BCSCs 的干性维持

为了进一步探究 ST8SIA6-AS1 对 BCSCs 的干性维持的影响,构建了过表达 ST8SIA6-AS1 的慢病毒包装质粒 pLVX-ST8SIA6-AS1,通过获得其活性慢病毒构建了稳定过表达 ST8SIA6-AS1 的细胞模型 SKBR3-Vector、SKBR3-ST8SIA6-AS1 和 Hs578T-Vector、Hs578T-ST8SIA6-AS1。首先,利用 qRT-PCR 技术验证了 ST8SIA6-AS1 过表达效率(图 2.5 A)。CCK-8 细胞活力实验结果表明,过表达 ST8SIA6-AS1 后,SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力显著上调(图 2.5 B-C)。同时,Transwell 实验结果表明,过表达 ST8SIA6-AS1 后,细胞迁移能力大幅度上调(图 2.5 D-E)。

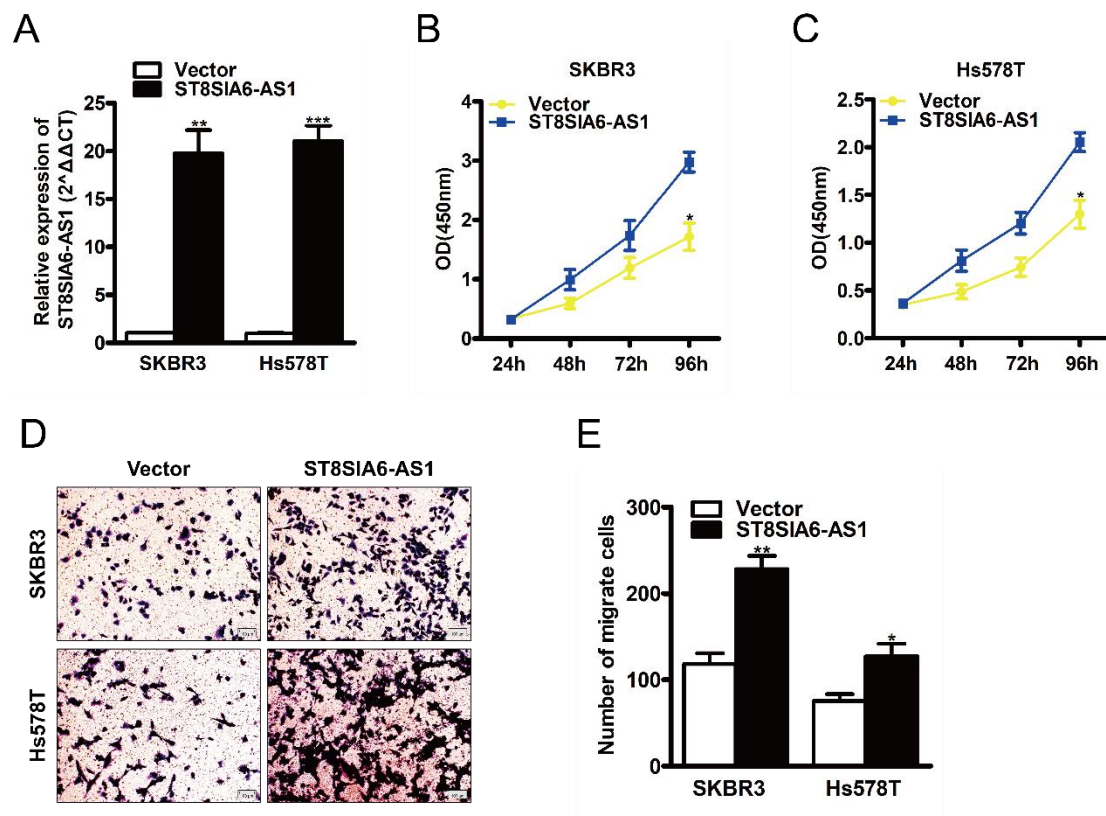


图 2.5 过表达 ST8SIA6-AS1 促进乳腺癌细胞的增殖与迁移

A. qRT-PCR 验证 ST8SIA6-AS1 的过表达效率; B. ST8SIA6-AS1 过表达后 SKBR3 细胞活力检测; C. ST8SIA6-AS1 过表达后 Hs578T 细胞活力检测; D-E. ST8SIA6-AS1 过表达后细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 2.5 Overexpression of ST8SIA6-AS1 promotes the proliferation and migration of

breast cancer cells

A. qRT-PCR to verify the overexpression efficiency of ST8SIA6-AS1; **B.** SKBR3 cell viability assay after ST8SIA6-AS1 overexpression; **C.** Viability assay of Hs578T cells after ST8SIA6-AS1 overexpression; **D-E.** Detection and quantification of cell migration ability after ST8SIA6-AS1 overexpression.

qRT-PCR 和免疫印迹法结果显示, 过表达 ST8SIA6-AS1 后, 细胞中多能干细胞转录因子 c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的表达不同程度上调 (图 2.6 A-C)。悬浮干细胞成球实验结果表明, 与对照组相比, ST8SIA6-AS1 的过表达增加了 BCSCs 的成球能力, 其大小和数量明显增加 (图 2.6 D-E)。细胞对化疗药紫杉醇和多柔比星的抵抗力上调 (图 2.6 F-G)。细胞克隆实验结果表明, 过表达 ST8SIA6-AS1 后, SKBR3 和 Hs578T 的细胞克隆形成的能力显著上升 (图 2.6 H-I)。

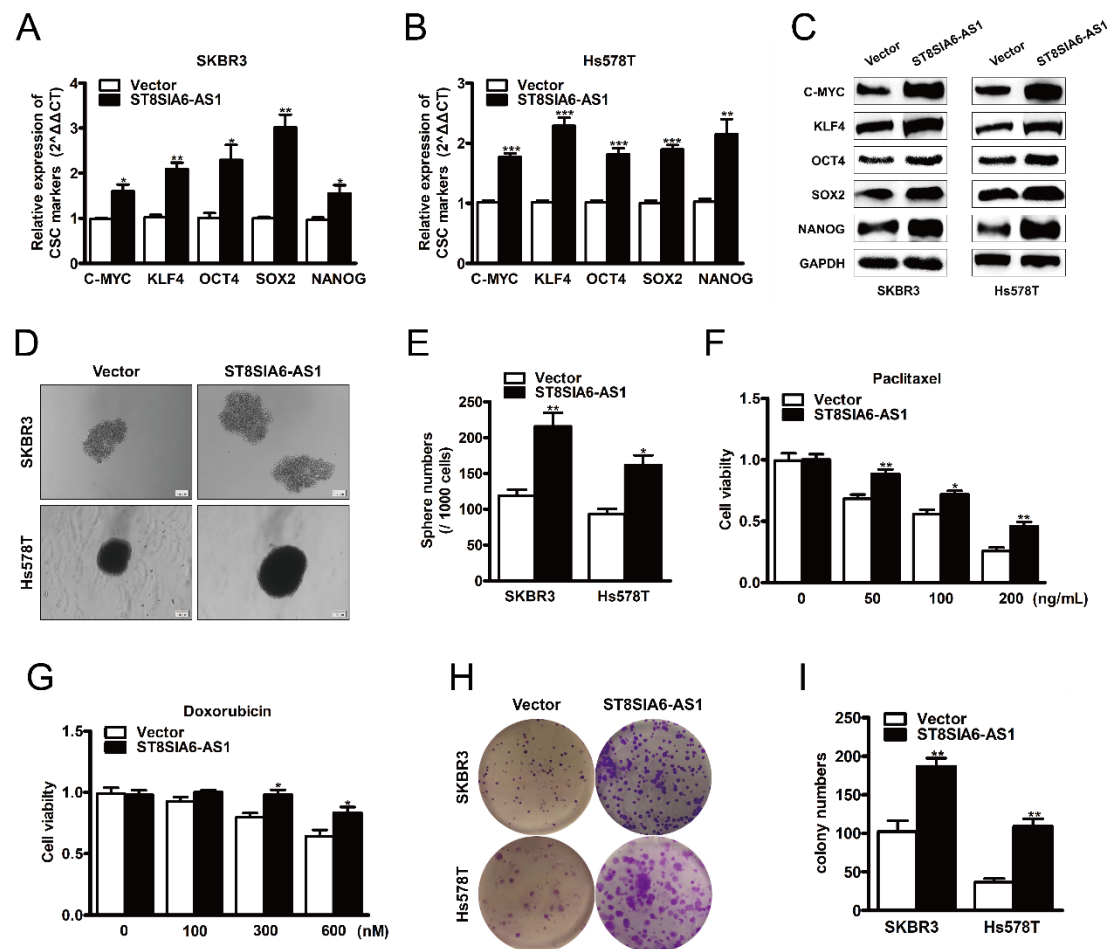


图 2.6 过表达 ST8SIA6-AS1 促进 BCSCs 的干性维持

A. ST8SIA6-AS1 过表达后 SKBR3 细胞中干性标志物 mRNA 表达水平的检测；**B.** ST8SIA6-AS1 过表达后 Hs578T 细胞中干性标志物 mRNA 表达水平的检测；**C.** ST8SIA6-AS1 过表达后细胞中干性标志物蛋白表达水平的检测；**D-E.** ST8SIA6-AS1 过表达后干细胞悬浮球体形成能力的检测；**F-G.** ST8SIA6-AS1 过表达后 SKBR3 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力检测；**H-I.** ST8SIA6-AS1 过表达后细胞克隆形成能力的检测。

Figure 2.6 Overexpression of ST8SIA6-AS1 promotes the maintenance of BCSCs stemness

A. Detection of stemness marker mRNA expression levels in SKBR3 cells after ST8SIA6-AS1 overexpression; **B.** Detection of stemness marker mRNA expression levels in Hs578T cells after ST8SIA6-AS1 overexpression; **C.** Detection of stemness marker protein expression levels in cells after ST8SIA6-AS1 overexpression; **D-E.** Assay of stem cell suspension sphere formation ability after ST8SIA6-AS1 overexpression; **F-G.** Assay of resistance of SKBR3 cells to paclitaxel and doxorubicin after ST8SIA6-AS1 overexpression; **H-I.** Assay of cell clone-forming ability after ST8SIA6-AS1 overexpression.

2.5 讨论

转移性乳腺癌无法得到治愈的最重要的原因是乳腺癌肿瘤干细胞的存在。目前为止，寻求对于该类患者的可能的治疗策略集中在乳腺癌肿瘤干细胞的机制研究上。lncRNA ST8SIA6-AS1 已经被发现在其它癌症中发挥功能，比如在肝癌中影响其增殖、迁移、侵袭和耐药等；在垂体腺瘤中促进 EMT 转化和血管生成；促进胃癌的发生发展等。但是目前关于乳腺癌的报道很少，对于 ST8SIA6-AS1 参与肿瘤干细胞干性特征调控的文章更是没有。在本节中，发现 ST8SIA6-AS1 在乳腺癌中的表达量显著高于癌旁组织的表达量，并且高表达 ST8SIA6-AS1 组的患者比低表达 ST8SIA6-AS1 组的患者预后更差，提示 ST8SIA6-AS1 可能促进乳腺癌的发生发展。首先构建了稳定敲低 ST8SIA6-AS1 的 SKBR3 和 Hs578T 细胞系，CCK8 实验结果表明，敲低 ST8SIA6-AS1 的细胞生长减弱；细胞迁移实验结果表明，敲低 ST8SIA6-AS1 的细胞迁移效率降低，提示 ST8SIA6-AS1 可以影响乳腺癌的增殖和迁移。然后，为了探究 ST8SIA6-AS1 是否可以影响乳腺癌干细胞的干性维持作用，检测了干性标志物的表达，qRT-PCR 和 WB 实验结果表明，在 ST8SIA6-AS1 敲低后，干性标志物的表达显著下降；另外，干细胞球体形成实验表明，ST8SIA6-AS1 敲低后，细胞形成干细胞悬浮球体的数量和大小都发生了显著的下降；化疗药物抵抗实验表明，敲低 ST8SIA6-AS1 后的细胞耐药能力明显减弱；克隆形成实验证明，敲低 ST8SIA6-AS1 后的细胞克隆形成能力下降明显。另外，过表达 ST8SIA6-AS1 可以得到跟上述结果完全相反的现象。根据

以上所有实验结果,可以得出初步结论,ST8SIA6-AS1有可能可以成为乳腺癌的一个新的生物标志物,并且可以影响乳腺癌的增殖迁移和肿瘤干细胞干性的维持。为 ST8SIA6-AS1 调控 BCSCs 干性维持提供了前期的实验基础,在后续的研究中,将试图寻找 ST8SIA6-AS1 的下游调控因子,进一步阐明 ST8SIA6-AS1 调控 BCSCs 干性维持的分子机制。

第 3 章 LncRNA ST8SIA6-AS1 通过调控 COL3A1 维持 BCSCs 干性

3.1 前言

III 型胶原蛋白在 1971 年首次被鉴定和描述^[211]，是一种重要的结构蛋白，被归类为主要的纤维状胶原蛋白之一^[212]，约占人体整个胶原蛋白含量的 5-20%。在人类基因组中，编码 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的 COL3A1 位于 2 号染色体的长臂上 2q32.2^[213]。COL3A1 基因的突变导致血管型埃勒斯-丹洛斯综合征（Vascular Ehlers-Danlos Syndrome, vEDS），这是一种罕见的、危及生命的遗传性疾病。一些没有明显 vEDS 症状的动脉瘤患者也被发现有 COL3A1 基因突变^[214]。其他与 COL3A1 相关的疾病表型包括以额叶多毛症为特征的脑部异常，以及许多纤维化疾病，在这些疾病中，在不同的器官中发现有更多的 III 型胶原蛋白。

一些证据表明，COL3A1 的表达受到转录后水平的调节。参与调控 COL3A1 表达的生物途径包括转化生长因子 $\beta 1$ (Transforming Growth Factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、Wnt/ β -catenin 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) 途径。Duval 等人表明，缺氧会改变 III 型胶原蛋白的表达，即缺氧导致培养的软骨细胞中 COL3A1 的 mRNA 和蛋白水平下降^[215]。Shaikh 等人表明，在人类皮肤成纤维细胞中，腺苷通过其受体发挥作用，并通过经典和非经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路刺激 COL3A1 的表达^[216]。有趣的是，在这个实验系统中，Wnt/ β -catenin 途径不参与 I 型胶原蛋白的表达。表皮生长因子 (EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF; 也叫 FGF2) 通过 MAPK 信号增强了人类皮肤成纤维细胞中 COL3A1 mRNA 和蛋白质的表达^[217]。Mi 等人使用人类羊膜成纤维细胞培养物和羊膜组织的外植体，证明皮质醇降低了 COL3A1 蛋白，但没有降低 mRNA 水平^[218]。进一步的研究显示，蛋白质水平的降低可能是由于泛素-蛋白酶体途径介导的降解。Yuan 等人用 TGF $\beta 1$ 处理培养的人类皮肤成纤维细胞，发现 COL3A1 的 mRNA 水平增加^[219]。

一些实验表明，COL3A1 在人类癌症中表达异常，并参与癌症的发生发展，比如肺癌^[220]、胃癌^[221]等。本章主要目的是探讨 COL3A1 在乳腺癌中的表达及预后情况，以及 COL3A1 是否能够参与乳腺癌的恶性转化和干性维持。

3.2 实验材料

3.2.1 细胞系

同第二章实验材料中 2.2.1 所述。

3.2.2 主要试剂

同第二章实验材料中 2.2.2 所述。

3.2.3 主要实验耗材

同第二章实验材料中 2.2.3 所述。

3.2.4 主要实验仪器与设备

同第二章实验材料中 2.2.4 所述。

3.2.5 质粒

质粒信息同第二章实验材料中 2.2.5 所述,另外使用到的质粒有 pLVX-EF1A-G418 和 pLKO.1-G418,质粒信息如表 3.1 所示。为了构建 COL3A1 过表达质粒, COL3A1 原序列被插入质粒 pLVX-EF1A 中用于构建过表达 COL3A1 质粒 pLVX-COL3A1。COL3A1 敲降质粒: pLKO.1-sh-COL3A1#1, pLKO.1-sh-COL3A1#2 和 pLKO.1-sh-COL3A1#3 委托武汉擎科生物科技有限公司设计与构建,敲降位点序列信息如表 3.2 所示。质粒构建过程中使用的引物序列委托武汉擎科生物科技有限公司合成。质粒图谱如附录 4 中的图 5-6 所示。

表 3.1 质粒信息

Table 3.1 Plasmid information

质粒名称	来源
pLVX-EF1A-G418	武汉科技大学生命科学与健康学院保存
pLKO.1-G418	武汉科技大学生命科学与健康学院保存

表 3.2 COL3A1 敲降位点序列信息

Table 3.2 COL3A1 knockdown site sequence information

敲降质粒名称	敲降序列
pLKO.1-sh-COL3A1#1	GGAGAATGTTGTGCAGTTT
pLKO.1-sh-COL3A1#2	CGATGAGATTATGACTTCA
pLKO.1-sh-COL3A1#3	GATGCAAATTGGATGCTAT

3.2.6 主要试剂配制

同第二章实验材料中 2.2.6 所述。

3.3 实验方法

3.3.1 细胞培养

同第二章实验方法中 2.3.1 所述。

3.3.2 细胞复苏与冻存

同第二章实验方法中 2.3.2 所述。

3.3.3 质粒构建与提取

同第二章实验方法中 2.3.3 所述。构建 COL3A1 过表达质粒过程中所使用到的引物如表 3.3 所示。本章构建的质粒有 pLVX-COL3A1-Puro、pLVX-COL3A1-G418、pLKO.1-sh-COL3A1#2-G418。

表 3.3 质粒构建引物序列信息

Table 3.3 Primer information for plasmid construction

引物名称	序列（5'引物至 3'）
COL3A1-CDS	F: ATGATGAGCTTTGTGCAA
	R: TTATAAAAAGCAAACAGG

引物名称	序列（5'引物至 3'）
pLVX-COL3A1-CDS	F:
	AGGATCTATTTCCGGTGAATTCATGATGAGCTTTGTGC
	AA
	R:
	GGGAGGGAGAGGGGCGGGATCCTTATAAAAAGCAAA
	CAGG

3.3.4 细胞转染

同第二章实验方法中 2.3.4 所述。

3.3.5 慢病毒包装与侵染

同第二章实验方法中 2.3.5 所述。

3.3.6 慢病毒滴度分析

同第二章实验方法中 2.3.6 所述。

3.3.7 qRT-PCR 实验

本章所涉及到的 qRT-PCR 实验信息同第二章实验方法中 2.3.7 所述。另外使用的 COL3A1 的引物信息如表 3.4 所示。

表 3.4 qPCR 引物序列信息

Table 3.3 qPCR primer sequence information

基因名称	引物序列（5'引物至 3'）
COL3A1	F: GGAGCTGGCTACTTCTCGC
	R: GGGAACATCCTCCTTCAACAG

3.3.8 蛋白质免疫印迹分析

本章所涉及到的蛋白质免疫印迹分析实验信息同第二章实验方法中 2.3.8 所述。另外使用到的 COL3A1 的抗体信息如表 3.5 所示。

表 3.5 WB 第一抗体信息

Table 3.5 WB Primary Antibody Information

名称	品牌	货号	WB 实际条带大小 (kDa)
COL3A1	Abmart	T510299	150

3.3.9 细胞活力分析

同第二章实验方法中 2.3.9 所述。

3.3.10 细胞迁移分析

同第二章实验方法中 2.3.10 所述。

3.3.11 细胞克隆形成

同第二章实验方法中 2.3.11 所述。

3.3.12 生物信息学分析

同第二章实验方法中 2.3.13 所述。

3.3.13 数据统计

同第二章实验方法中 2.3.13 所述。

3.4 结果

3.4.1 COL3A1 在乳腺癌中高表达且与预后不良相关

本章，依然使用仙桃学术对 TCGA 数据库中 BRCA 患者的 COL3A1 的表达谱进行了分析。与 113 例癌旁组织相比，COL3A1 在 1099 例 BRCA 患者中表达显著上升（图 3.1 A）。同样的，联合 GTEx 数据库中的正常样本组织数后，与 292 例正常样本相比，COL3A1 在 1099 例 BRCA 患者中表达依然是显著升高的（图 3.1 B）。在配对的 112 列样本中，COL3A1 的表达依然是显著升高的（图 3.1 C）。

为了确定 COL3A1 在乳腺癌患者中的预后价值, Kaplan-Meier Plotter 被用来分析 TCGA 数据库中 COL3A1 的表达与乳腺癌患者总体生存率 (OS) 和无病生存率 (DFS) 的关系。如图 3.1 D-E 所示, 与 COL3A1 低表达组相比, COL3A1 高表达组的乳腺癌患者的 OS ($P = 0.06$)、DFS ($P = 0.027$) 都显著更低。

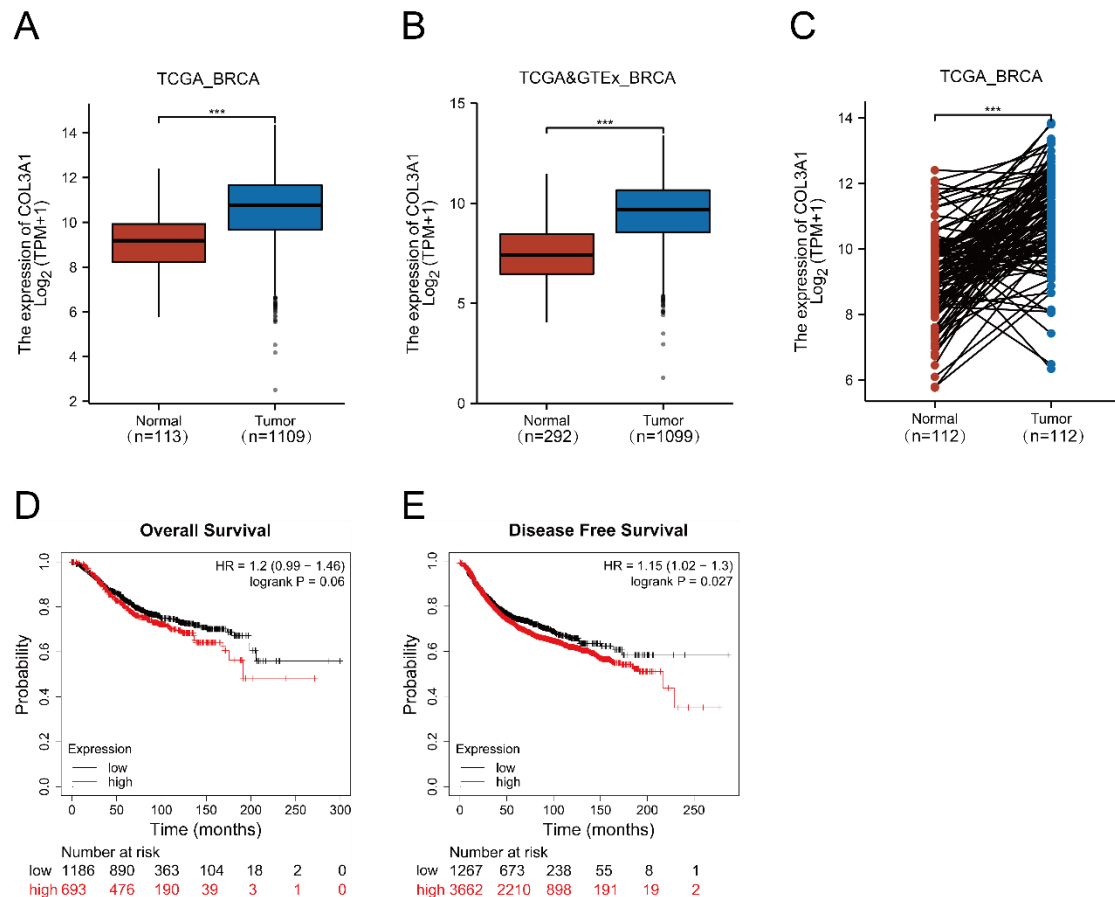


图 3.1 COL3A1 在 BRCA 患者中表达升高且与预后不良相关

A. TCGA_BRCA 数据库中 COL3A1 的表达水平; **B.** TCGA_BRCA & GTEx 联合数据库中 COL3A1 的表达水平; **C.** TCGA_BRCA 数据库中配对患者中 COL3A1 的表达水平; **D-E.** Kaplan-Meier Plotter 绘制 TCGA 数据库中 COL3A1 表达与 BRCA 患者 OS, DFS 的关系。

Figure 3.1 COL3A1 expression is elevated in BRCA patients and associated with poor prognosis

A. Expression levels of COL3A1 in TCGA_BRCA database; **B.** Expression levels of COL3A1 in the combined TCGA_BRCA & GTEx database; **C.** Expression levels of COL3A1 in paired patients in TCGA_BRCA database; **D-E.** Kaplan-Meier Plotter plotting of TCGA database COL3A1 expression in relation to OS, DFS in BRCA patients.

为了验证 COL3A1 是否在乳腺癌细胞系中高表达，通过 qRT-PCR 和 WB 分析了 COL3A1 在人乳腺癌细胞系中 mRNA 和蛋白的表达水平。使用到的细胞系有 MCF10A、SKBR3、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 Hs578T。结果如图 3.2 A 所示，在 mRNA 水平上来看，与 MCF10A 相比，只有人乳腺癌细胞系 SKBR3 和 Hs578T 的上升显著；在蛋白水平上看，MDA-MB-468 表现出了下降，SKBR3 和 Hs578T 表现出了显著上调（图 3.2 B）。跟上一章节的实验结果保持一致，SKBR3 和 Hs578T 将被用于开展后续实验。在 BCSCs 富集实验中，与原代贴壁细胞相比，悬浮干细胞球体中 COL3A1 的表达水平也发生了显著的上调，如图 3.2 B-C 所示。

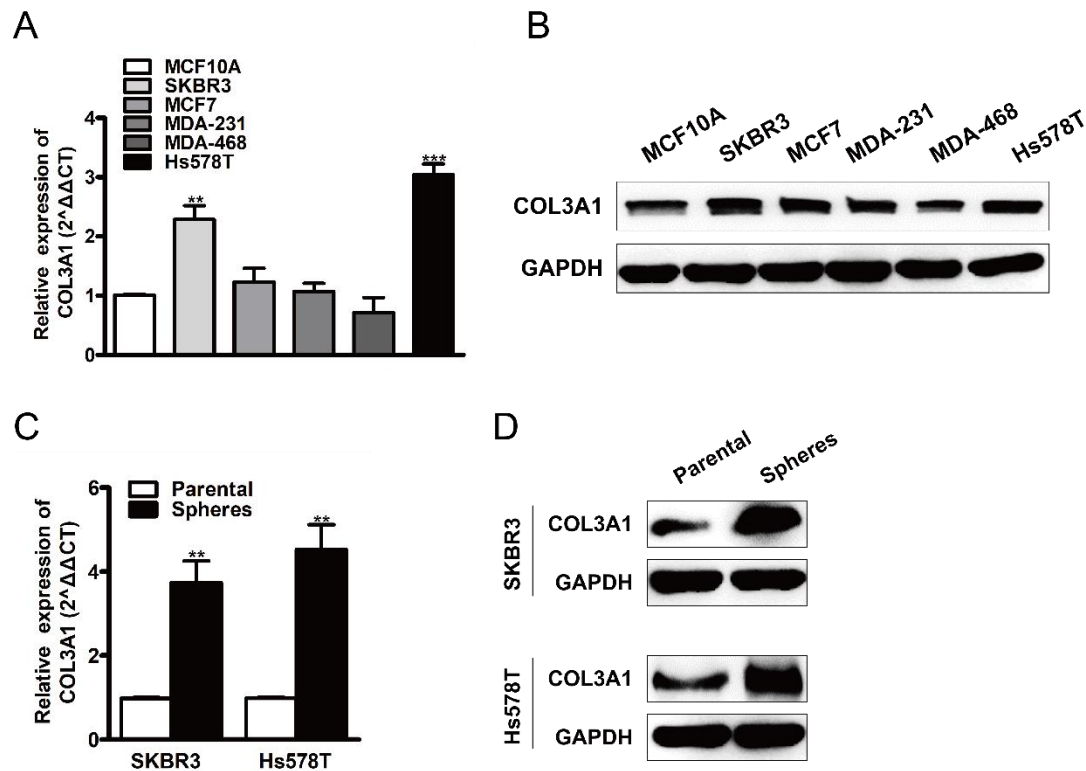


图 3.2 COL3A1 在乳腺癌细胞系及 BCSCs 中表达升高

A. COL3A1 在乳腺癌细胞系的 mRNA 表达水平检测；B. COL3A1 在乳腺癌细胞系的蛋白水平检测；C. COL3A1 在 BCSCs 的 mRNA 表达水平检测；D. COL3A1 在 BCSCs 的蛋白表达水平检测。

Figure 3.2 Elevated expression of COL3A1 in breast cancer cell lines and BCSCs

A. Detection of mRNA expression level of COL3A1 in breast cancer cell lines; B. Detection of protein level of COL3A1 in breast cancer cell lines; C. Detection of mRNA expression level of

COL3A1 in BCSCs; **D**. Detection of protein expression level of COL3A1 in BCSCs.

3.4.2 敲低 COL3A1 抑制 BCSCs 干性

同样的,构建了3个不同位点的 shRNA 慢病毒,用于构建稳定敲低 COL3A1 的细胞系,构建成功的细胞系有 SKBR3-shNC、SKBR3-shCOL3A1#1、SKBR3-shCOL3A1#2、SKBR3-shCOL3A1#3 和 Hs578T-shNC、Hs578T-shCOL3A1#1、Hs578T-shCOL3A1#2、Hs578T-shCOL3A1#3。结果如图 3.3 A 所示,跟 ST8SIA6-AS1 敲降结果一致,shRNA#2 的敲低效果要明显优于 shRNA#1 和 shRNA#3,因此后续实验将使用的细胞系是 SKBR3-shCOL3A1#2 和 Hs578T-shCOL3A1#2。如图 3.3 B-C 所示,CCK-8 细胞活力实验结果表明,COL3A1 敲低后,SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力,在 48 h, 72 h, 96 h 时,相较于对照组,细胞活力都有所下降。此外,敲低 COL3A1 后的 SKBR3 和 Hs578T 的细胞迁移能力下降(图 3.3 D-E)。

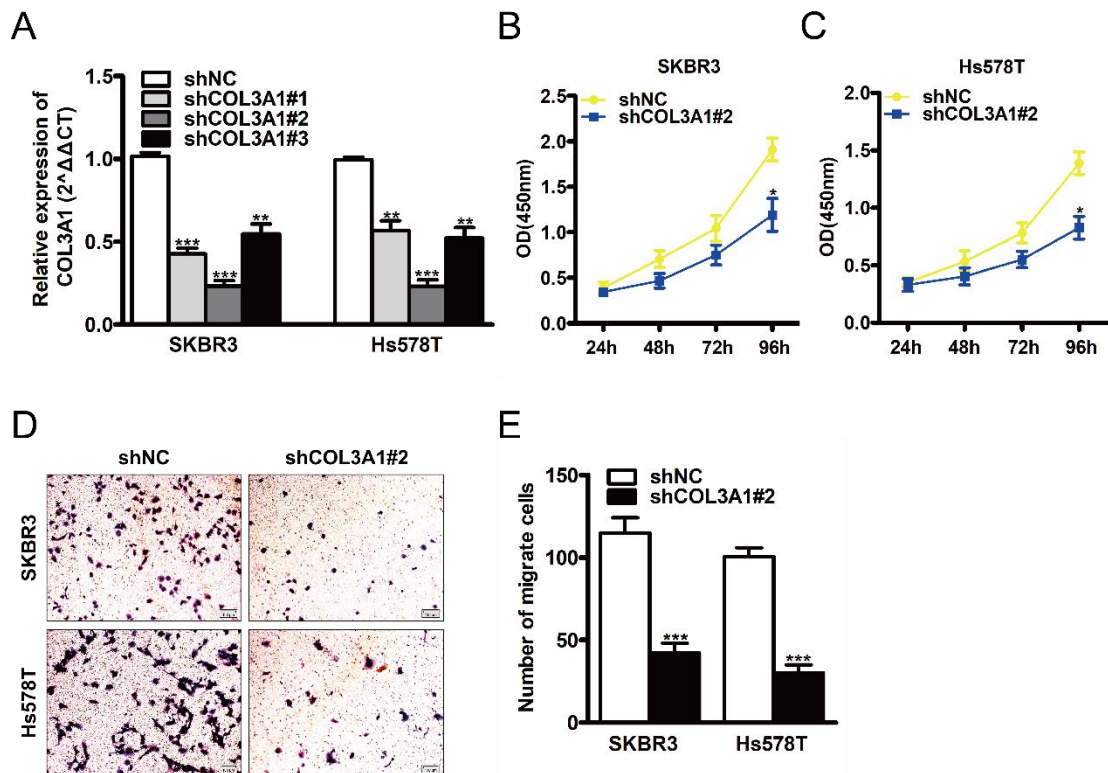


图 3.3 敲低 COL3A1 抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移

A. qRT-PCR 验证 COL3A1 的敲低效率; **B.** COL3A1 敲低后 SKBR3 细胞活力检测; **C.** COL3A1 敲低后 Hs578T 细胞活力检测; **D-E.** COL3A1 敲低后细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 3.3 Knockdown of COL3A1 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells

A. qRT-PCR to verify the knockdown efficiency of COL3A1; **B.** SKBR3 cell viability assay after COL3A1 knockdown; **C.** Viability assay of Hs578T cells after COL3A1 knockdown; **D-E.** Detection and quantification of cell migration ability after COL3A1 knockdown.

为了进一步验证 COL3A1 敲低对 BCSCs 的干性维持的影响, 检测了多能干性转录因子 c-Myc、SOX2、KLF4、Nanog 和 OCT4 的表达。结果如图 3.4 A-C 表明, 敲低 COL3A1 后, 干性标志物的 mRNA 和蛋白表达水平发生了显著的降低。通过悬浮干细胞球体实验发现, 敲低 COL3A1 后, SKBR3 和 Hs578T 的细胞成球大小和数量减少 (图 3.4 D-E)。在耐药实验中, 结果如图 3.4 F-G 所示, 在随着紫杉醇和多柔比星的浓度的上升后, SKBR3 细胞的活力也随之降低, 这表明细胞对其的抵抗力也在下降。敲低 COL3A1 后, SKBR3 和 Hs578T 细胞克隆形成的数量也发生了大幅度减少 (图 3.4 H-I)。

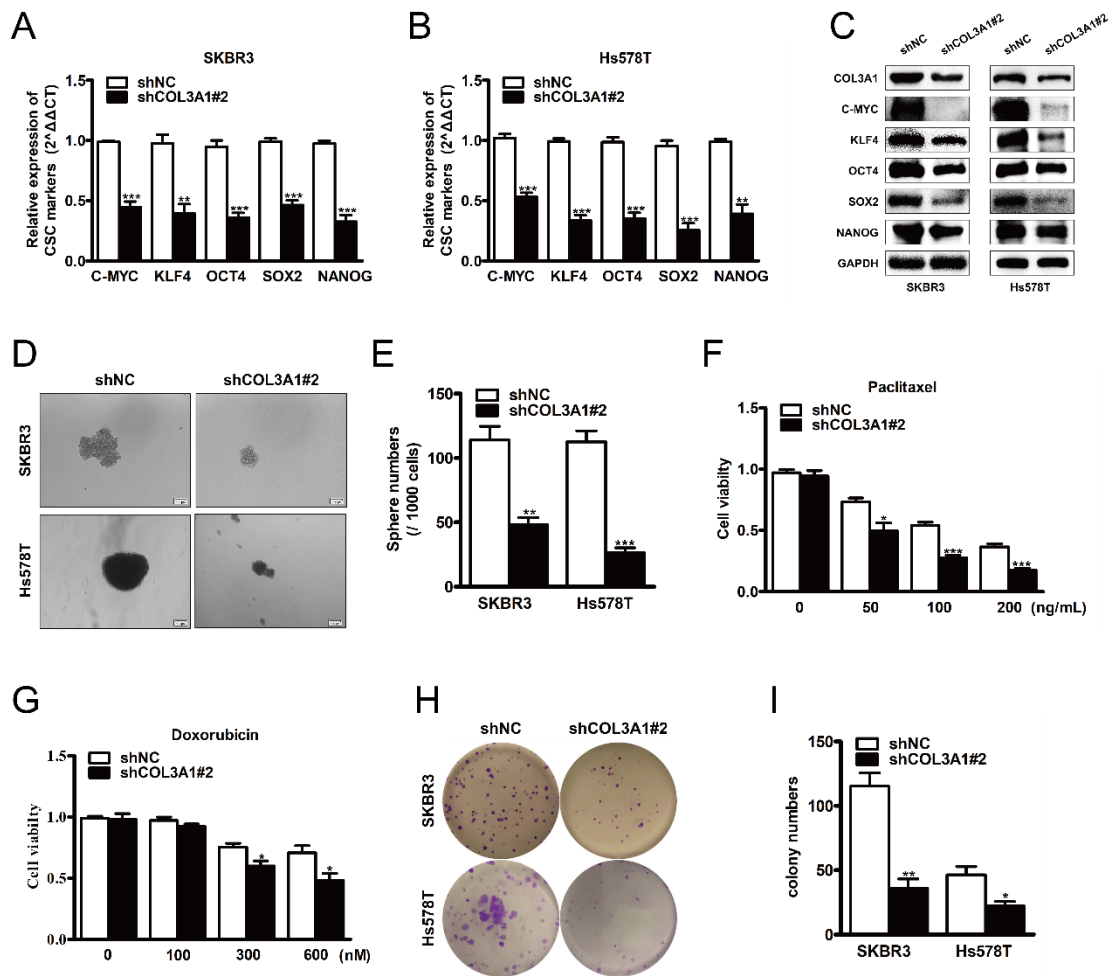


图 3.4 敲低 COL3A1 抑制 BCSCs 的干性维持

A. COL3A1 敲低后 SKBR3 细胞中干性转录因子 mRNA 表达水平的检测；**B.** COL3A1 敲低后 Hs578T 细胞中干性转录因子 mRNA 表达水平的检测；**C.** COL3A1 敲低后细胞中干性转录因子蛋白表达水平的检测；**D-E.** COL3A1 敲低后细胞悬浮球体形成能力的检测与量化；**F-G.** COL3A1 敲低后 SKBR3 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力检测；**H-I.** COL3A1 敲低后细胞克隆形成能力的检测。

Figure 3.4 Knockdown of COL3A1 inhibits stemness maintenance in BCSCs

A. Detection of stemness transcription factor mRNA expression levels in SKBR3 cells after COL3A1 knockdown; **B.** Detection of stemness transcription factor mRNA expression levels in Hs578T cells after COL3A1 knockdown; **C.** Detection of stemness transcription factor protein expression levels in cells after COL3A1 knockdown; **D-E.** Detection and quantification of cell suspension sphere formation ability after COL3A1 knockdown; **F-G.** Detection of resistance of SKBR3 cells to paclitaxel and doxorubicin after COL3A1 knockdown; **H-I.** Detection of clonogenic ability of cells after COL3A1 knockdown.

3.4.3 过表达 COL3A1 促进 BCSCs 干性

为了探究 COL3A1 过表达后对 BCSCs 的干性维持的作用，构建了过表达 COL3A1 的慢病毒包装质粒 pLVX-COL3A1，且成功构建了稳定过表达 COL3A1 的细胞模型 SKBR3-Vector、SKBR3-COL3A1 和 Hs578T-Vector、Hs578T-COL3A1。利用 qRT-PCR 技术验证了 COL3A1 过表达效率（图 3.5 A）。CCK-8 细胞活力实验结果表明，过表达 COL3A1 后，SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力显著上调（图 3.5 B-C）。同时，过表达 COL3A1 后，SKBR3 和 Hs578T 细胞的迁移能力大幅度上调（图 3.5 D-E）。

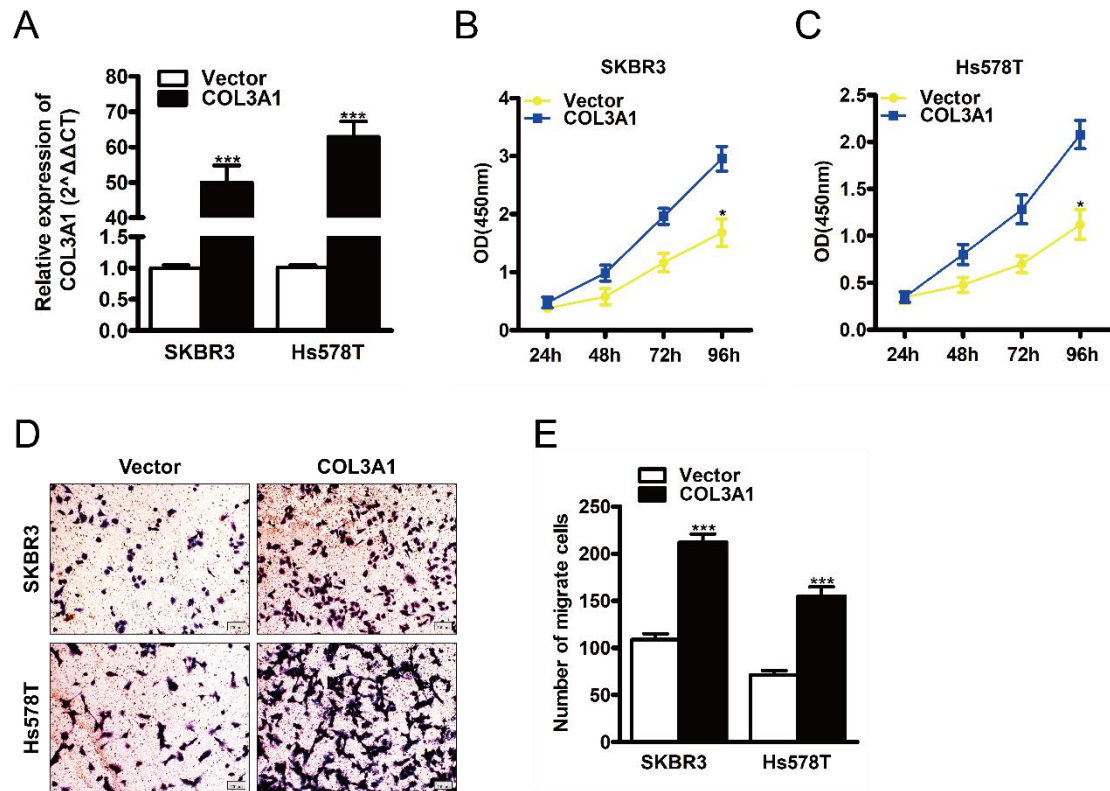


图 3.5 过表达 COL3A1 促进乳腺癌细胞的增殖与迁移

A. qRT-PCR 验证 COL3A1 的过表达效率；B. COL3A1 过表达后 SKBR3 细胞活力检测；C. COL3A1 过表达后 Hs578T 细胞活力检测；D-E. COL3A1 过表达后细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 3.5 Overexpression of COL3A1 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells

A. qRT-PCR to verify the overexpression efficiency of COL3A1; B. SKBR3 cell viability assay after COL3A1 overexpression; C. Viability assay of Hs578T cells after COL3A1 overexpression; D-E. Detection and quantification of cell migration ability after COL3A1 overexpression.

qRT-PCR 和免疫印迹法结果显示，过表达 COL3A1 后，细胞中多能干细胞转录因子 c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的表达不同程度上调（图 3.6 A-C）。悬浮干细胞成球实验结果表明，与对照组相比，COL3A1 的过表达增加了 BCSCs 的成球能力，其大小和数量明显增加（图 3.6 D-E）。SKBR3 细胞对化疗药紫杉醇和多柔比星的抵抗力上调（图 3.6 F-G）。细胞克隆实验结果表明，过表达 COL3A1 后，SKBR3 和 Hs578T 的细胞克隆形成的能力显著上升（图 3.6 H-I）。

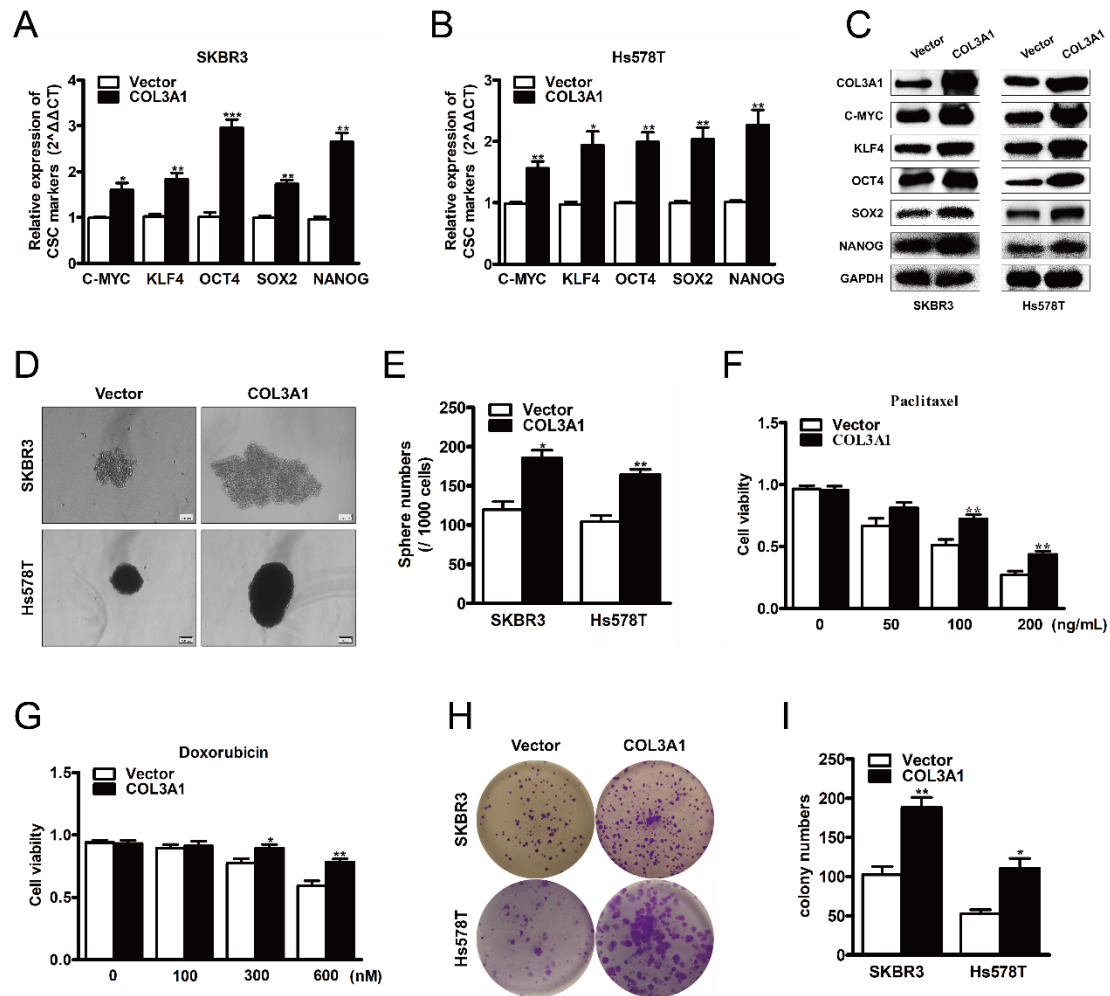


图 3.6 过表达 COL3A1 促进 BCSCs 的干性维持

A. COL3A1 过表达后 SKBR3 细胞中干性转录因子 mRNA 表达水平的检测；**B.** COL3A1 过表达后 Hs578T 细胞中干性转录因子 mRNA 表达水平的检测；**C.** COL3A1 过表达后细胞中干性转录因子蛋白表达水平的检测；**D-E.** COL3A1 过表达后细胞悬浮球体形成能力的检测与量化；**F-G.** COL3A1 过表达后 SKBR3 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力检测；**H-I.** COL3A1 过表达后细胞克隆形成能力的检测。

Figure 3.6 Overexpression of COL3A1 promotes stemness maintenance in BCSCs

A. Detection of stemness transcription factor mRNA expression levels in SKBR3 cells after COL3A1 overexpression; **B.** Detection of stemness transcription factor mRNA expression levels in Hs578T cells after COL3A1 overexpression; **C.** Detection of stemness transcription factor protein expression levels in cells after COL3A1 overexpression; **D-E.** Detection and quantification of cell suspension sphere formation ability after COL3A1 overexpression; **F-G.** Detection of resistance of SKBR3 cells to paclitaxel and doxorubicin after COL3A1 overexpression; **H-I.** Detection of cellular clonogenic ability after COL3A1 overexpression.

3.4.4 ST8SIA6-AS1 通过调控 COL3A1 维持 BCSCs 干性

另外,为了验证 COL3A1 是否能够被 ST8SIA6-AS1 所调控,分析了 ST8SIA6-AS1 敲低或过表达后 COL3A1 的 mRNA 和蛋白水平的变化情况,如图 3.7 A-B 所示,在 ST8SIA6-AS1 敲低后, COL3A1 的表达水平,在 SKBR3 和 Hs578T 中显著下调;在 ST8SIA6-AS1 过表达后, COL3A1 的表达水平随之上调(图 3.7 C-D)。其一致的表达结果表明, COL3A1 是 ST8SIA6-AS1 下游的一个调控因子。

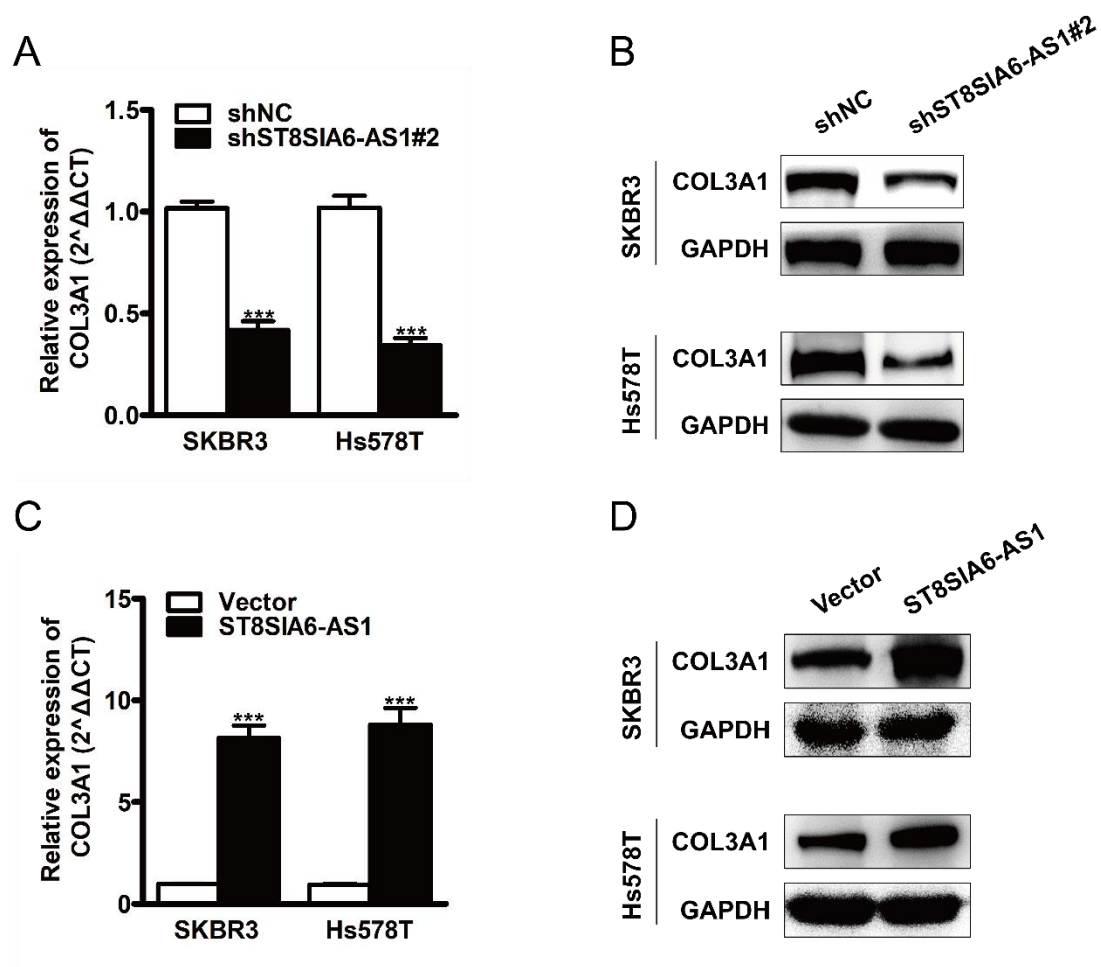


图 3.7 ST8SIA6-AS1 调控 COL3A1 表达

A. 敲低 ST8SIA6-AS1 组中 COL3A1 的 mRNA 表达检测; B. 敲低 ST8SIA6-AS1 组中 COL3A1 的蛋白表达检测; C. 过表达 ST8SIA6-AS1 组中 COL3A1 的 mRNA 表达检测; D. 过表达 ST8SIA6-AS1 组中 COL3A1 的蛋白表达检测。

Figure 3.7 ST8SIA6-AS1 regulates COL3A1 expression

A. mRNA expression assay of COL3A1 in the knockdown ST8SIA6-AS1 group; **B.** Protein expression assay of COL3A1 in the knockdown ST8SIA6-AS1 group; **C.** mRNA expression assay of COL3A1 in the overexpression ST8SIA6-AS1 group; **D.** Protein expression assay of COL3A1 in the overexpression ST8SIA6-AS1 group.

为了进一步确定 ST8SIA6-AS1 是否可以通过调控 COL3A1 维持 BCSC 干性,开展了回复实验。如图 3.8 A 所示,在敲低 ST8SIA6-AS1 后的细胞系中过表达 COL3A1 不仅可以引起 COL3A1 的增加,同时干性标志物 c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的表达也会发生不同程度的上调(图 3.8 B);在 SKBR3-shST8SIA6-AS1-2 和 Hs578T-shST8SIA6-AS1-2 细胞系中过表达 COL3A1 后,细胞迁移能力也得到了显著提高(图 3.8 C-D)。同样的,相对于 ST8SIA-AS1 敲降细胞系,过表达 COL3A1 后,乳腺癌细胞悬浮干细胞球体形成的能力(图 3.8 E-F)和细胞克隆形成能力(图 3.8 G-H)都得到了显著的恢复。

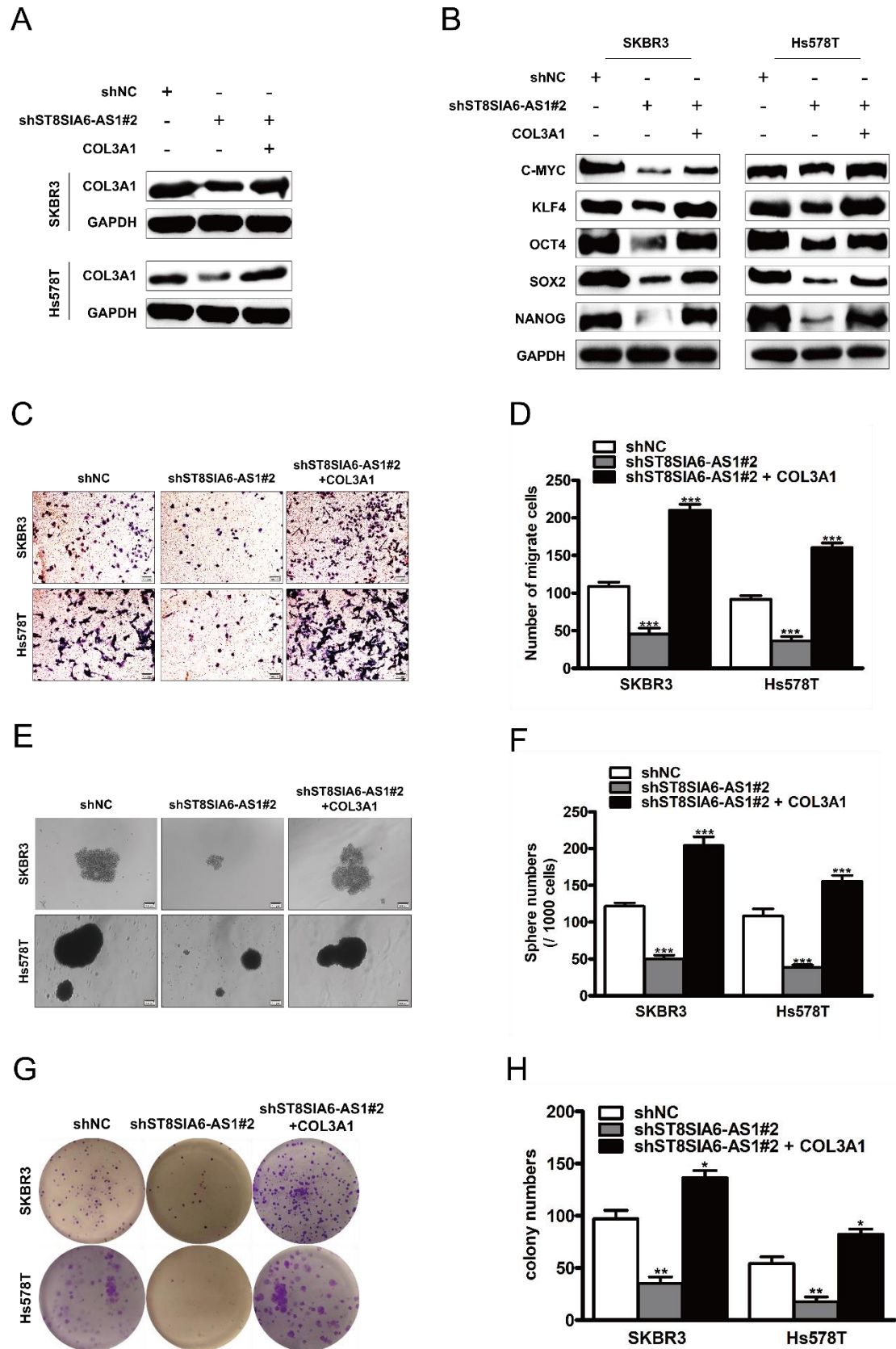


图 3.8 ST8SIA6-AS1 敲低后通过过表达 COL3A1 恢复 BCSC 干性

A. 免疫印迹法检测对照组，敲低 ST8SIA6-AS1 组，同时敲低 ST8SIA6-AS1 和过表达

COL3A1 组中 COL3A1 的表达；**B.** 干性标志物的表达。在对照组，敲低 ST8SIA6-AS1 组，同时敲低 ST8SIA6-AS1 和过表达 COL3A1 组中检测 **C-D.** 细胞迁移能力；**E-F.** 干性球体形成能力的变化；**G-H.** 克隆形成能力。

Figure 3.8 Restoration of BCSC stemness by overexpression of COL3A1 after ST8SIA6-AS1 knockdown

A. Immunoblotting assays to detect COL3A1 expression in control, knockdown ST8SIA6-AS1 group, simultaneous knockdown ST8SIA6-AS1 and overexpression COL3A1 group; **B.** Expression of stemness markers. In the control group, knockdown ST8SIA6-AS1 group, simultaneous knockdown ST8SIA6-AS1 and overexpression COL3A1 group were detected in **C-D.** cell migration ability; **E-F.** changes in stemness sphere formation ability; **G-H.** clone formation ability.

反过来，在过表达 ST8SIA6-AS1 后的细胞系中敲低 COL3A1，得到了相反的结果。如图 3.9 A-B 所示，在 SKBR3-ST8SIA6-AS1 和 Hs578T-ST8SIA6-AS1 细胞系中稳定敲低 COL3A1 后，COL3A1 的表达水平下调，干性标志物 c-Myc、Sox2、Klf4、Nanog 和 Oct4 的表达也会发生不同程度的下降；相较于 ST8SIA6-AS1 过表达的细胞系，敲降 COL3A 后，SKBBR3 和 Hs578T 细胞的迁移能力（图 3.9 C-D）、干性球体形成的能力（图 3.9 E-F）和克隆形成的能力（图 3.9 G-H）都发生了大幅度减弱。

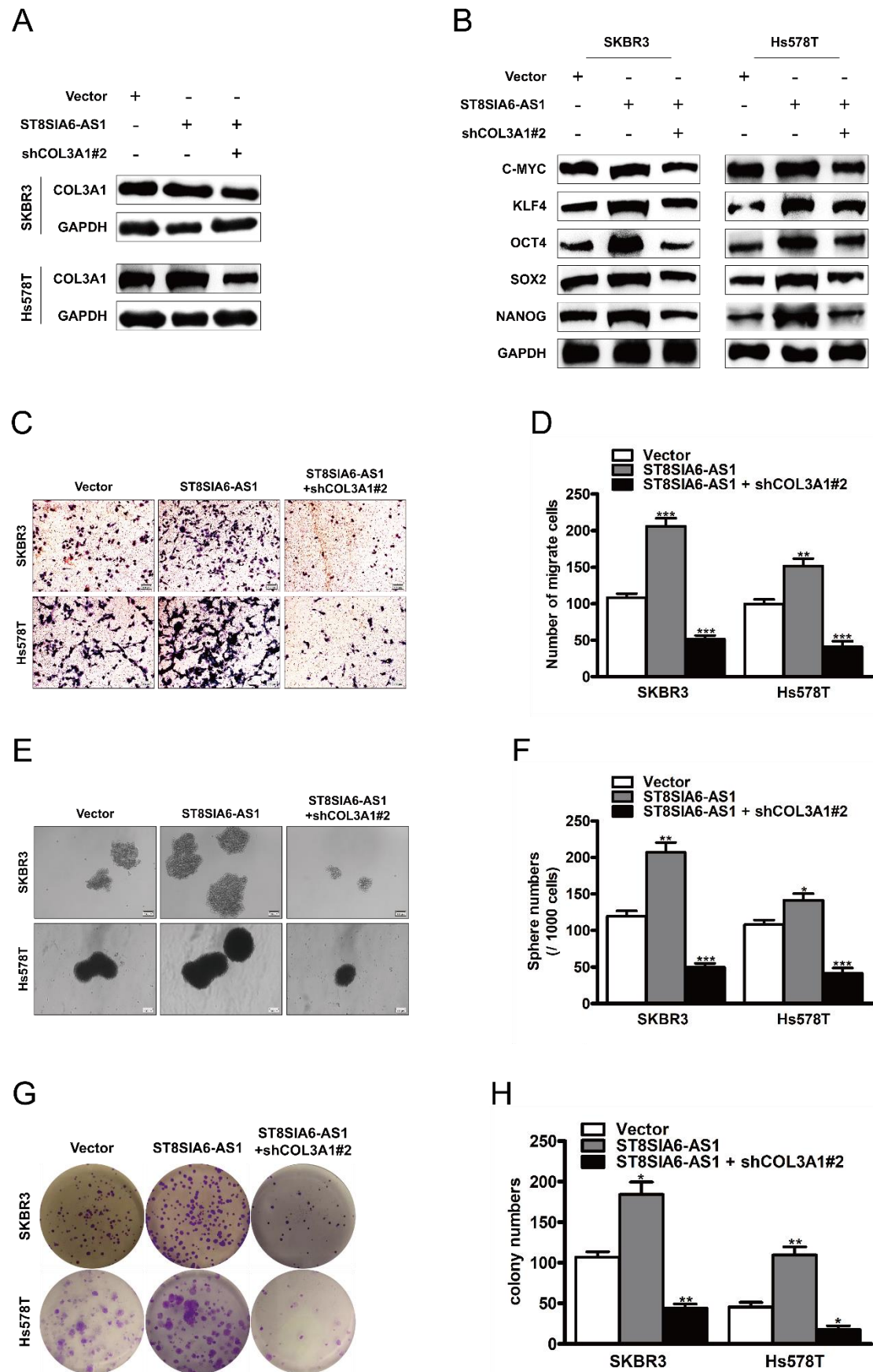


图 3.9 ST8SIA6-AS1 过表达后通过敲低 COL3A1 抑制 BCSC 干性

A. 免疫印迹法检测对照组，过表达 ST8SIA6-AS1 组，同时过表达 ST8SIA6-AS1 和敲低 COL3A1 组中 COL3A1 的表达；B. 干性标志物的表达。在对照组，过表达 ST8SIA6-AS1 组，同时过表达 ST8SIA6-AS1 和敲低 COL3A1 组中检测 C-D. 细胞迁移能力；E-F. 克隆形成能力；G-H. 干性球体形成能力的变化。

Figure 3.9 Inhibition of BCSC stemness by knocking down COL3A1 after ST8SIA6-AS1 overexpression

A. Immunoblotting assay to detect the expression of COL3A1 in the control group, overexpression of ST8SIA6-AS1 group, simultaneous overexpression of ST8SIA6-AS1 and knockdown of COL3A1 in the group; B. Expression of stemness markers. Changes in C-D. cell migration ability; E-F. clone formation ability; G-H. stemness sphere formation ability were detected in the control group, the group overexpressing ST8SIA6-AS1, the group simultaneously overexpressing ST8SIA6-AS1 and the group knocking down COL3A1.

3.5 讨论

近 50 年来对 III 型胶原蛋白的结构和功能的研究表明，它是血管、子宫和肠道的一个重要结构成分。如果没有 III 型胶原蛋白，小鼠会在子宫内死亡，如果有变异的 III 型胶原蛋白，人类会出现严重的临床表现，导致因动脉、肠道或子宫自发破裂而过早死亡。此外，一些 COL3A1 的突变会导致严重的大脑异常和发育迟缓。在许多获得性人类纤维化疾病，如肾脏和肝脏纤维化，以及系统性硬化症中发现 III 型胶原蛋白的数量增加。已知 III 型胶原蛋白在纤维素形成过程中与 I 型和 II 型胶原蛋白相互作用，是纤维素直径的重要调节器；III 型胶原蛋白含量的增加将导致纤维素的形成更薄。III 型胶原蛋白也是血小板聚集的关键成分，从而启动血液凝固级联。

在本节中，发现 COL3A1 在乳腺癌中的表达量上调，并且高表达 COL3A1 组的患者比低表达 COL3A1 组的患者预后更差，提示 COL3A1 可能促进乳腺癌的发生发展。同样的，首先构建了稳定敲低 COL3A1 的 SKBR3 和 Hs578T 细胞系，CCK8 实验结果表明，敲低 COL3A1 的细胞生长减弱；细胞迁移实验结果表明，敲低 COL3A1 的细胞迁移效率降低，提示 COL3A1 可以影响乳腺癌的增殖和迁移。然后，为了探究 COL3A1 是否可以影响乳腺癌干细胞的干性维持作用，检测了干性标志物的表达，qRT-PCR 和 WB 实验结果表明，干性标志物的表达显著下降在 COL3A1 敲低后；另外，干细胞球体形成实验表明，COL3A1 敲低后，细胞形成干细胞悬浮球体的数量和大小都发生了显著的下降；化疗药物抵抗实验表明，敲低 COL3A1 后的细胞耐药能力明显减弱；克隆形成实验证明，敲低

COL3A1 后的细胞克隆形成能力下降明显。另外，过表达 COL3A1 可以得到跟上述结果完全相反的现象。

另外，COL3A1 作为 ST8SIA6-AS1 的下游调控因子也得到了验证。发现，在 ST8SIA6-AS1 敲低或者过表达后，COL3A1 的 mRNA 和蛋白表达水平也跟着下降或者上调。根据回复实验结果得知，在敲降 ST8SIA6-AS1 的细胞株中重新过表达 COL3A1，细胞的增殖和迁移得到显著恢复，另外细胞的肿瘤干性特征也得到了显著的修复，表现在干性标志物表达的回升，悬浮干细胞球体的数量和大小的上调，细胞克隆形成的能力的显著恢复。相反的是，在过表达 ST8SIA6-AS1 的细胞中，对 COL3A1 进行敲降，会得到跟之前完全相反的结果。

根据以上所有实验结果，可以得出结论，COL3A1 有可能可以作为乳腺癌的一个新的生物标志物，并且影响乳腺癌的增殖迁移和肿瘤干细胞干性的维持，同时还是 lncRNA ST8SIA6-AS1 的一个下游调控因子。但是，ST8SIA6-AS1 是如何调控 COL3A1 的表达是未可知的，其有可能是直接与 COL3A1 mRNA 相结合，影响其稳定性；有可能参与调控了某个经典的信号通路，进而影响了通路中 COL3A1 的表达；也有可能通过 ceRNA 网络调控关系，通过一个未知的 miRNA，去影响 COL3A1 的蛋白表达等。在接下来的研究中，将进一步确认 ST8SIA6-AS1 调控 COL3A1 的具体分子机制。

第 4 章 LncRNA ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 干性维持

4.1 前言

一些实验表明, miRNA-410-3p 在人类疾病中表达异常, 并参与癌症的发生发展。miR-410-3p 可以被 circTMEM59 海绵状吸附去调控结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 细胞的增殖、迁移和侵袭, 其模拟物也逆转了 circTMEM59 对 CRC 细胞增殖和转移的抑制作用^[222]。miR-410-3p 通过靶向抑制 Smad7 介导了 Ang II 诱导的心脏肥大^[223]。miR-410-3p 在鼻咽癌组织中的表达与配对正常组织相比下调 ($P < 0.001$)^[224]。miR-410-3p 表达水平在结直肠癌中显著升高, miR-410-3p 介导的 ZCCHC10 抑制调节 NF- κ B 活化, 从而促进 EMT 过程、细胞迁移和 CRC 细胞侵袭^[225]。

本章主要目的是探讨 miRNA-410-3p 在乳腺癌中的表达及预后情况, 以及 miRNA-410-3p 是否能够参与乳腺癌的恶性转化和干性维持。另外, 需要确认的是 miRNA-410-3p 是否可以和 ST8SIA6-AS1 特异性结合, 与 COL3A1 的 3'UTR 端是否可以特异性结合。同时验证 ST8SIA6-AS1/miRNA-410-3p/COL3A1 三者之间的作用机制, 并探讨他们是否参与了 BCSCs 的干性维持过程。

4.2 实验材料

4.2.1 细胞系

同第二章实验材料中 2.2.1 所述。

4.2.2 主要试剂

同第二章实验材料中 2.2.2 所述。另外使用到的试剂如表 4.1 所示。

表 4.1 试剂信息

Table 4.1 Reagent information

试剂名称	生存厂家	货号
------	------	----

荧光素酶报告试剂盒	大连美仑，中国	MA0517
NheI	New England Biolabs，美国	R0131S
XhoI	New England Biolabs，美国	R0146S
miRNA mimic NC	武汉擎科，中国	-
miR-410-3p mimic	武汉擎科，中国	-
miR-410-3p inhibitor	武汉擎科，中国	-
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN 公司，美国	217004

4.2.3 主要实验耗材

同第二章实验材料中 2.2.3 所述。

4.2.4 主要实验仪器与设备

同第二章实验材料中 2.2.4 所述。

4.2.5 质粒

质粒信息同第二章实验材料中 2.2.5 所述，另外使用到的质粒有 Pmilglo，质粒信息如表 4.2 所示，质粒图谱如附录 4 中图 7 所示。miR-410 过表达质粒直接委托武汉擎科生物有限公司设计和合成。

表 4.2 质粒信息

Table 4.2 Plasmid information

质粒名称	来源
Pmilglo	武汉科技大学生命科学与健康学院保存

4.2.6 主要试剂配制

同第二章实验材料中 2.2.6 所述。

4.3 实验方法

4.3.1 细胞培养

同第二章实验材料中 2.3.1 所述。

4.3.2 细胞复苏与冻存

同第二章实验材料中 2.3.2 所述。

4.3.3 质粒构建与提取

同第二章实验材料中 2.3.3 所述。另外使用的引物序列信息如表 4.3 所示。

表 4.3 质粒构建引物序列信息

Table 4.3 Primer information for plasmid construction

引物名称	序列（5'引物至 3'）
Pmilglo-wild-ST8SIA6-AS1	F:
	GTTTAAACGAGCTCGCTAGCGAGAAGGGAGGAGTTA
	TTCA
	R:
Pmilglo-mutant-ST8SIA6-AS1	AGGTCGACTCTAGACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGG
	CATGTATATAACTGACATTAA
	F:
	GTTTAAACGAGCTCGCTAGCGAGAAGGGAGGAGTTA
COL3A1-3'UTR	TTCA
	R:
	AGGTCGACTCTAGACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGG
	CATGTCTCTGAGTGACATTAA
Pmilglo-wild-	F: ACCAAACTCTATCTGAAATC
	R: GAATTTTAATATGATATT
	F:
	GTTTAAACGAGCTCGCTAGCACCAAACTCTATCTGAA
Pmilglo-wild-	ATC
	R:

COL3A1-3'UTR	GCAGGTCGACTCTAGACTCGAGGAATTTTAATATGAT ATT
	F:
	CTTTATGATAACAACACTGTCTAAGAGTCTTTGAATC
Pmilglo-mutant-	CTAGCCCATC
COL3A1-3'UTR	R:
	GATGGGCTAGGATTCAAAGACTCTTAGACAGTGTTG TTATCATAAAG

4.3.4 细胞转染

同第二章实验材料中 2.3.4 所述。

4.3.5 慢病毒包装与侵染

同第二章实验材料中 2.3.5 所述。

4.3.6 慢病毒滴度分析

同第二章实验材料中 2.3.6 所述。

4.3.7 qRT-PCR 实验

实验信息同第二章实验材料中 2.3.7 所述。对于 miRNA 的提取，使用了新的试剂盒（miRNeasy Mini Kit, QIAGEN）。其操作流程如下：

（1）丢弃细胞培养皿中原始上清，PBS 清洗 2 遍，使用胰蛋白酶溶液消化，消化结束用完全培养基重悬细胞，300 g 离心 3 min，使用 PBS 溶液清洗两遍，获得细胞沉淀。

（2）加入 700 μ L QIAzol，涡旋震荡 1 min 使细胞充分裂解，室温静置孵育 5 min；然后加入 140 μ L 氯仿，剧烈摇滚 15 sec，室温静置 2 min；

（3）在提前 4℃ 预冷的离心机中 12000 g 离心 15 min，转移含有 RNA 的上层水相溶液至新的 EP 管，加入 1.5 倍体积的乙醇，上下颠倒混匀。

（4）取 700 μ L 上述混合液至 RNeasy Mini 吸附柱（装入 2 mL 收集管），12000 g 室温离心 15 sec。重复这一步骤。

（5）加入 700 μ L Buffer RWT，12000 g 室温离心 15 sec，丢弃废液。

(6) 加入 500 μ L Buffer RPE, 12000 g 室温离心 15 sec, 丢弃废液。重复这一步骤。

(7) 转移 RNeasy Mini 吸附柱至一个新的 EP 管中, 加入 30 μ L RNase-free 水, 12000 g 离心 1 min。

对于 miRNA 的 qRT-PCR 检测采用茎环法, 其逆转录反应是使用的引物是 GTCGTATCGACTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAGTCGATACGACACAGGC。qPCR 实验中检测 miR-410-3p 的引物信息如表 4.4 所示。

表 4.4 qPCR 引物序列信息

Table 4.4 qPCR primer sequence information

基因名称	引物序列 (5'引物至 3')
miRNA-410-3p	F: GCCGGCAATATAACACAGATG
	R: ACTGCAGGGTCCGAGGGTATT

4.3.8 蛋白质免疫印迹分析

同第二章实验材料中 2.3.8 所述。

4.3.9 细胞活力分析

同第二章实验材料中 2.3.9 所述。

4.3.10 细胞迁移分析

同第二章实验材料中 2.3.10 所述。

4.3.11 细胞克隆形成

同第二章实验材料中 2.3.11 所述。

4.3.12 荧光素酶报告实验

(1) 提前将 SKBR3 和 Hs578T 细胞系进行传代, 当细胞达到最合适的生长密度时, 将野生型荧光素酶报告基因质粒、突变型荧光素酶报告基因质粒、内参质粒共转染至目的细胞系中。

(2) 48 h 后, 吸弃原始培养基, 使用 PBS 缓冲液清洗一遍, 然后加入裂解液, 室温裂解 20 min。

(3) 按照试剂盒说明书配制萤光素酶检测工作液。

(4) 裂解结束后, 直接在裂解液中加入萤火虫萤光素酶检测工作液。

(5) 设置 Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪的参数, 测定样品在 OD560 nm 处的吸光度。

(7) 初次测定结束后, 加入海肾萤光素酶检测工作液。

(8) 设置 Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪的参数, 测定样品在 OD465 nm 处的吸光度。

4.3.13 裸鼠皮下成瘤

(1) 将 3-4 周龄的雌性裸鼠进行分组, 每组 4 只, 按照 $100\ \mu\text{L} / 10^7$ 个细胞密度配制细胞溶液。

(2) 用 1 mL 无菌注射器将细胞混合液注射到裸鼠腋下皮下, 继续喂养 4-5 周。

(3) 待肿瘤长到 0.8-1.4 cm 大小, 用断颈方式杀死裸鼠, 拍照获取图像, 用手术器械取出完整的肿瘤块, PBS 溶液洗 2 遍, 置于白色背景下拍照获取图像。

(4) 用钢尺量取肿瘤块大小数据, 用分析天平称量肿瘤块重量。

4.3.14 生物信息学分析

通过使用在线生物信息学分析网站及工具分析 TCGA 数据库中 miR-410-3p 的在乳腺癌患者中表达及在乳腺癌患者中的预后情况。具体使用的网站及工具有: UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 和 Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)。

4.3.15 数据统计

同第二章实验材料中 2.3.13 所述。

4.4 结果

4.4.1 miR-410-3p 在乳腺癌中低表达

本章, 通过在线网站 Starbase 对 TCGA 数据库中 BRCA 患者的 miR-410-3p 的表达谱进行了分析。与 104 例癌旁组织相比, miR-410-3p 在 1085 例 BRCA 患者中表达显著下降 (图 4.1 A)。作为 miR-410-3p 的前体, 又通过在线网站 UALCAN 对 TCGA 数据库中 BRCA 患者的 miR-410 的表达谱进行了分析, 同样的, 与 76 例正常样本相比, miR-410 在 749 例 BRCA 患者中表达依然是显著降低的 (图 4.1 B)。为了确定 miR-410-3p 在乳腺癌患者中的预后价值, Kaplan-Meier Plotter 被用来分析 TCGA 数据库中 miR-410-3p 的表达与乳腺癌患者总体生存率 (OS)。如图 4.1 C 所示, 与 miR-410-3p 高表达组相比, miR-410-3p 低表达组的乳腺癌患者的 OS ($P=6.1e-05$) 更低。在线网站 UALCAN 同样被用来分析 miR-410 的生存情况, 与 miR-410 高表达组 ($n=188$) 相比, miR-410 低表达组 ($n=560$) 的乳腺癌患者的 OS ($P=0.0033$) 更低 (图 4.1 D)。

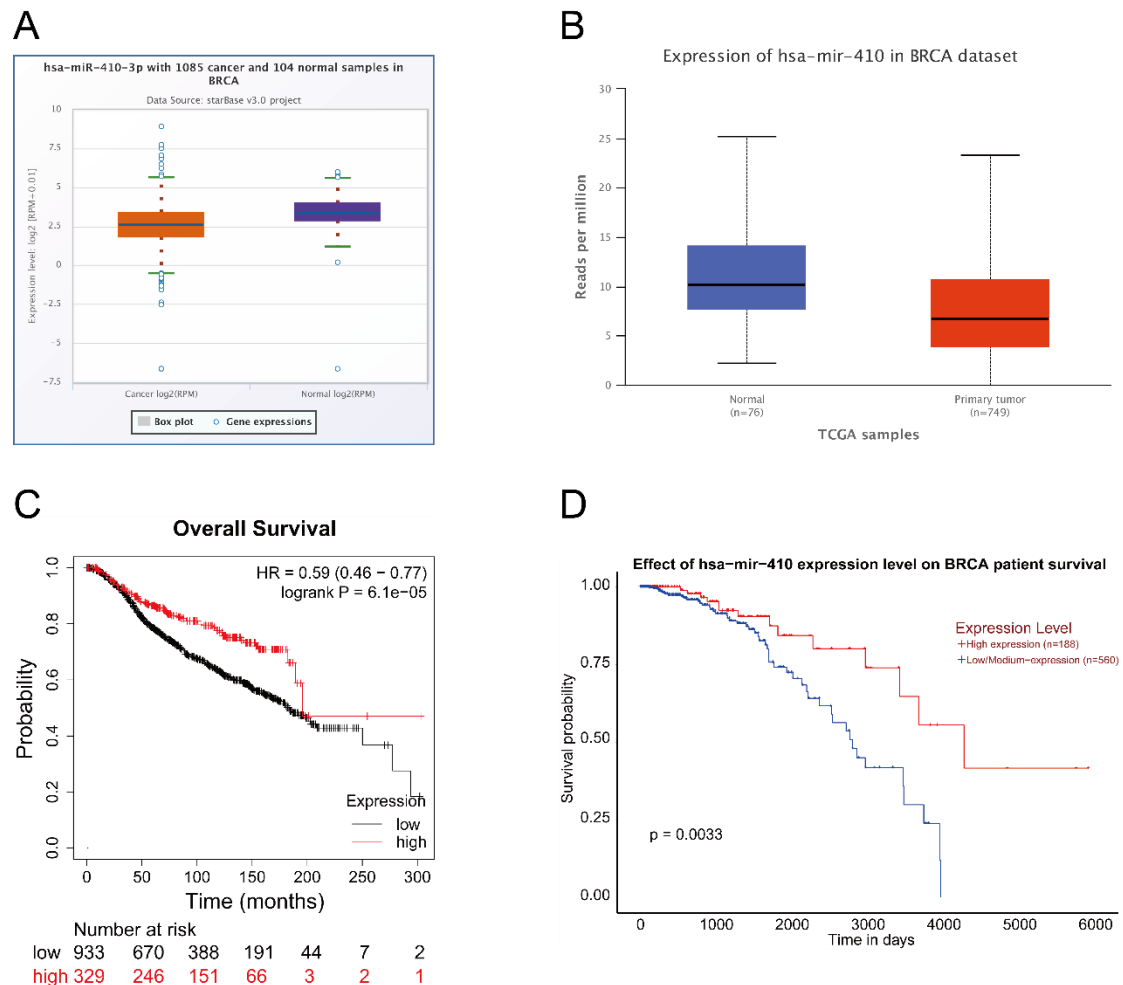


图 4.1 miR-410-3p 在 BRCA 患者中表达降低且与预后不良相关

A. Starbase 预测 TCGA_BRCA 数据库中 miR-410-3p 的表达水平；B. UALCAN 预测 TCGA_BRCA 数据库中 miR-410 的表达水平；C. Kaplan-Meier Plotter 绘制 TCGA 数据库中 miR-410-3p 表达与 BRCA 患者 OS 的关系；D. UALCAN 绘制 TCGA 数据库中 miR-410 表达与 BRCA 患者 OS 的关系。

Figure 1.3 miR-410-3p expression is reduced in BRCA patients and associated with poor prognosis

A. Starbase predicts the expression level of miR-410-3p in TCGA_BRCA database; B. UALCAN predicts the expression level of miR-410 in TCGA_BRCA database; C. Kaplan-Meier Plotter plots the relationship between miR-410-3p expression in TCGA database and OS in BRCA patients; D. UALCAN plots the relationship between miR-410 expression in the TCGA database and OS in BRCA patients.

为了验证 miR-410-3p 是否在乳腺癌细胞系中低表达，通过 qRT-PCR 分析了 miR-410-3p 在人乳腺癌细胞系中 mRNA 的表达水平，使用到的细胞系有 MCF10A、SKBR3、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 Hs578T。结果如图 4.2 A 所示，与 MCF10A 相比，只有人乳腺癌细胞系 SKBR3 和 Hs578T 的下降显著，MCF7 和 MDA-MB-231 表达基本无差异，但是 miR-410-3p 在 MDA-MB-468 中表达显著上调。跟前面章节的实验结果保持一致，因此 SKBR3 和 Hs578T 将被用于开展后续实验。在 BCSCs 富集实验中，与原代贴壁细胞相比，悬浮干细胞球体中 miR-410-3p 的表达水平也发生了显著的下降，如图 4.2 B 所示。

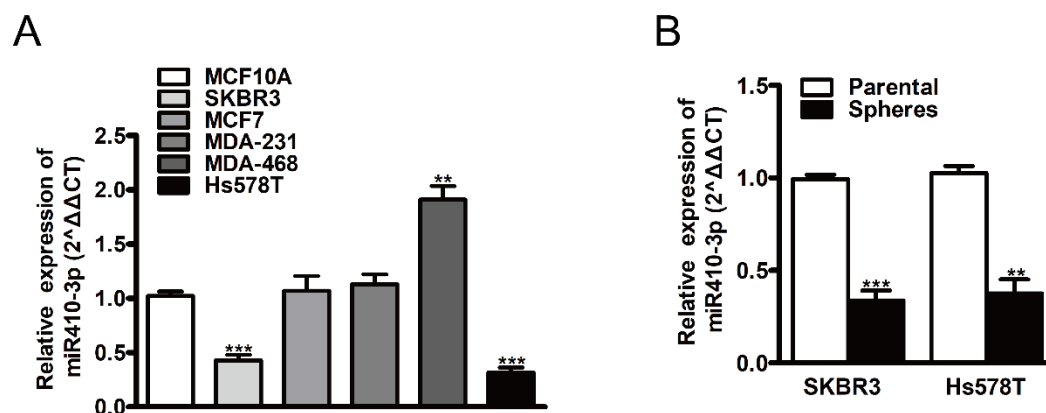


图 4.2 miR-410-3p 在乳腺癌细胞系中表达降低

A. miR-410-3p 在乳腺癌细胞系的表达水平检测; B. miR-410-3p 在 SKBR3 和 Hs578T 的肿瘤干细胞中的表达水平检测。

Figure 4.2 Reduced expression of miR-410-3p in breast cancer cell lines

A. Expression levels of miR-410-3p in breast cancer cell lines were detected; B. Expression levels of miR-410-3p in tumor stem cells of SKBR3 and Hs578T were detected.

4.4.2 稳定过表达 miR-410 在细胞水平抑制 BCSCs 干性

为了探究 miR-410-3p 过表达后对 BCSCs 的干性维持的作用, 构建了过表达 miR-410 的慢病毒包装质粒 pLVX-miR-410, 构建了稳定过表达 miR-410 的细胞模型 SKBR3-miR-410 和 Hs578T-miR-410。利用 qRT-PCR 技术验证了 miR-410 过表达后 miR-410-3p 的表达水平 (图 4.3 A)。CCK-8 细胞活力实验结果表明, 过表达 miR-410-3p 后, SKBR3 和 Hs578T 的细胞活力显著下降 (图 4.3 B-C)。同时, 过表达 miR-410-3p 后, 细胞迁移能力大幅度下调 (图 4.3 D-E)。

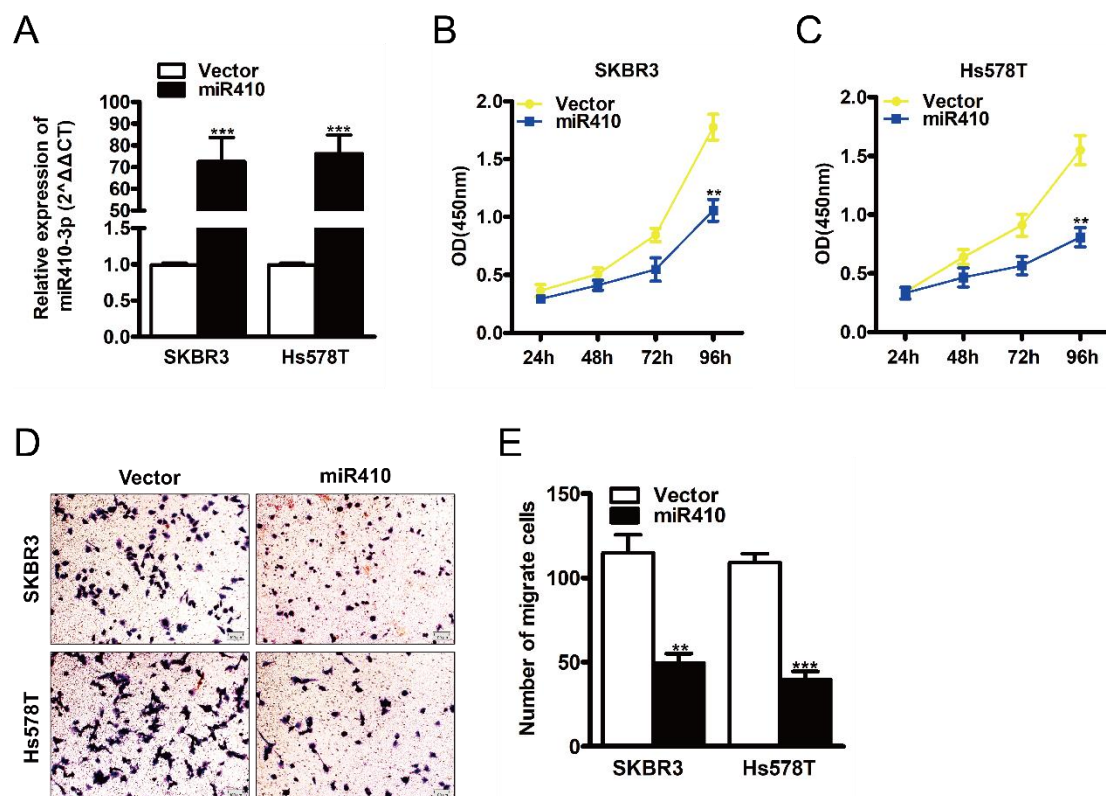


图 4.3 过表达 miR-410 抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移

A. qRT-PCR 验证 miR-410-3p 的过表达效率; B. miR-410 过表达后 SKBR3 细胞活力检测。

C. miR-410 过表达后 Hs578T 细胞活力检测；D-E. miR-410 过表达后细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 4.3 Overexpression of miR-410 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells

A. qRT-PCR to verify the overexpression efficiency of miR-410-3p; B. SKBR3 cell viability assay after miR-410 overexpression; C. Viability assay of Hs578T cells after miR-410 overexpression; D-E. Detection and quantification of cell migration ability after miR-410 overexpression.

免疫印迹法结果显示，过表达 miR-410-3p 后，细胞中干性标志物 c-Myc, Sox2, Klf4, Nanog 和 Oct4 的表达不同程度下降（图 4.4 A）。悬浮干细胞成球实验结果表明，与对照组相比，miR-410-3p 的过表达降低了 BCSCs 的成球能力，其大小和数量明显下降（图 4.4 B-C）。同样的，过表达 miR-410-3p 后，SKBR3 细胞对化疗药紫杉醇和多柔比星的抵抗力下降（图 4.4 D-E）。细胞克隆实验结果表明，过表达 miR-410-3p 后，SKBR3 和 Hs578T 的细胞克隆形成的能力显著下降（图 4.4 F-G）。

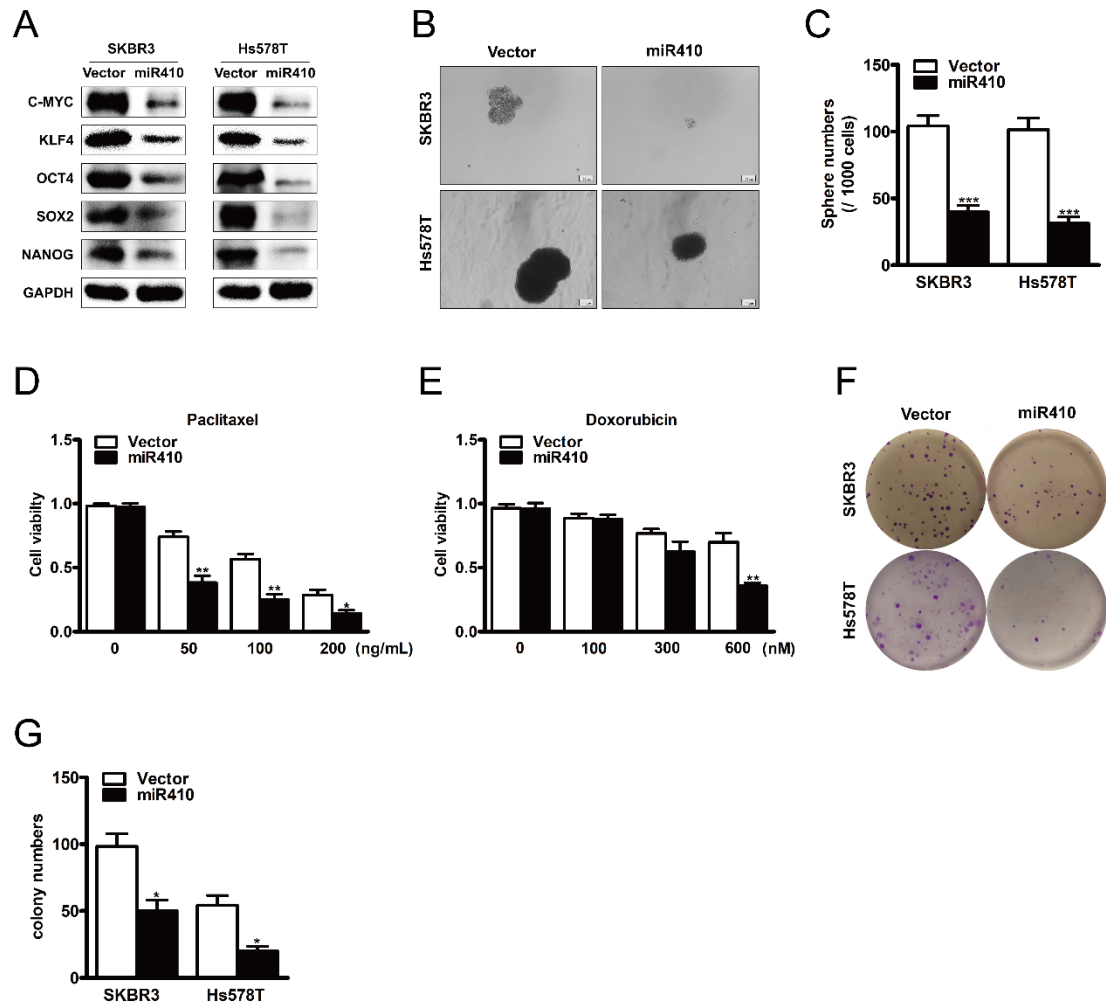


图 4.4 过表达 miR-410 抑制 BCSCs 的干性维持

A. miR-410 过表达后细胞多能干性转录因子蛋白表达水平的检测；**B-C.** miR-410 过表达后细胞悬浮球体形成能力的检测；**D-E.** 过表达 miR-410 后 SKBR3 细胞对紫杉醇和多柔比星的抵抗力检测；**F-G.** miR-410 过表达后细胞克隆形成能力的检测。

Figure 4.4 Overexpression of miR-410 inhibits stemness maintenance in BCSCs

A. Detection of cellular pluripotent stemness transcription factor protein expression levels after miR-410 overexpression; **B-C.** Detection of cellular suspension sphere formation ability after miR-410 overexpression; **D-E.** Detection of resistance of SKBR3 cells to paclitaxel and doxorubicin after miR-410 overexpression; **F-G.** Detection of cellular clone formation ability after miR-410 overexpression.

4.4.3 荧光素酶实验验证 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴关系

为了验证 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 是否存在轴调控的关系, 通过在线网站分析了 miR-410-3p 与 ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 存在的特异性结合位点。如图 4.5 A-B 所示, 在 ST8SIA6-AS1 的序列上存在 miR-410-3p 的特异性结合位点, 且该位点与 COL3A1 的 3'UTR 上 miR-410-3p 的结合位点一致。这些生物信息学上的预测表明, ST8SIA6-AS1 非常有可能通过内源竞争 RNA 的原理通过 miR-410-3p 进而调控 COL3A1 的表达去调控 BCSC 的干性维持。

为了验证 miR-410-3p 是否可以与 ST8SIA6-AS1 结合, 构建了包含野生型和点突变型 ST8SIA6-AS1 的荧光素酶报告基因质粒载体 Pmilglo-ST8SIA6-AS1-WT 和 Pmilglo-ST8SIA6-AS1-MT。然后将其分别转染到 SKBR3 和 Hs578T 细胞中, 在共同转染 miR-410-3p mimic 24 小时后测定其荧光素酶活性。结果如图 4.5 C-D 所示, 与转染 miRNA-NC mimic 相比, miR-410-3p 的过表达可以下调 Pmilglo-ST8SIA6-AS1-WT 荧光素酶报告基因的活性, 而对 Pmilglo-ST8SIA6-AS1-MT 荧光素酶报告基因的活性几乎没有影响。

同样的, 为了验证 miR-410-3p 是否可以与 COL3A1 结合, 构建了包含野生型和点突变型 COL3A1 的荧光素酶报告基因质粒载体 Pmilglo-COL3A1-WT 和 Pmilglo-COL3A1-MT。结果如图 4.5 E-F 所示, 与转染 miR-NC mimic 相比, miR-410-3p 的过表达可以下调 Pmilglo-COL3A1-WT 荧光素酶报告基因的活性, 而对 Pmilglo-COL3A1-MT 荧光素酶报告基因的活性几乎没有影响。

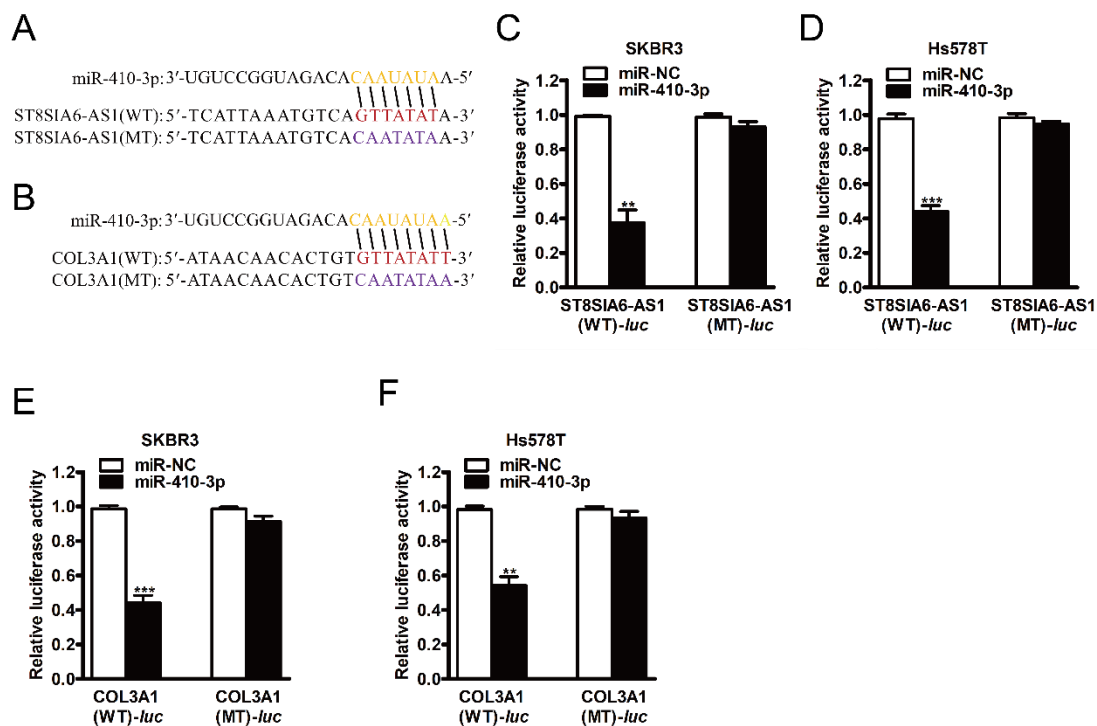


图 4.5 ST8SIA6-AS1 通过竞争性结合 miR-410-3p 调控 COL3A1 的表达

A. ST8SIA6-AS1 序列上与 miR-410-3p 特异性结合位点示意图; B. COL3A1 序列上与 miR-410-3p 特异性结合位点示意图; C. SKBR3 和 Hs578T 细胞中 miR-410-3p 过表达后 ST8SIA6-AS1 的荧光素酶活性; D. SKBR3 和 Hs578T 细胞中 miR-410-3p 过表达后 COL3A1 的荧光素酶活性。

Figure 4.5 ST8SIA6-AS1 regulates COL3A1 expression through competitive binding of miR-410-3p

A. Schematic diagram of the specific binding site to miR-410-3p on ST8SIA6-AS1 sequence; B. Schematic diagram of the specific binding site to miR-410-3p on COL3A1 sequence; C. Luciferase activity of ST8SIA6-AS1 after miR-410-3p overexpression in SKBR3 and Hs578T cells; D. Luciferase activity of COL3A1 after miR-410-3p overexpression in SKBR3 and Hs578T cells.

4.4.4 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 干性维持

另外, 为了进一步验证 miR-410-3p 是否跟 ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 有调控关系, 分析了 ST8SIA6-AS1 敲低或过表达后 miR-410-3p 的表达情况。如图 4.6 A 所示, 在 ST8SIA6-AS1 敲低后, miR-410-3p 的表达水平, 在 SKBR3 和 Hs578T 中显著上调; 相反, 在 ST8SIA6-AS1 过表达后, miR-410-3p 的表达水平随之下降 (图 4.6 B)。同样的, 在 COL3A1 敲低和过表达后, miR-410-3p 的变化情况与 ST8SIA6-AS1 敲低和过表达后保持一致 (图 4.6 C-D)。最后, 在过表达 miR-410 后, 验证了 SKBR3 和 Hs578T 细胞系中 ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 的表达情况。如图 4.6 E 所示, 在过表达 miR-410 组中, ST8SIA6-AS1 的 mRNA 表达水平得到了显著抑制; 而 COL3A1 的 mRNA 和蛋白表达水平都发生了显著下调 (图 4.6 F-G)。结果表明, miR-410-3p 与 ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 分别存在调控关系, 但是他们三者之间是否存在调控关系, 需要进一步验证。

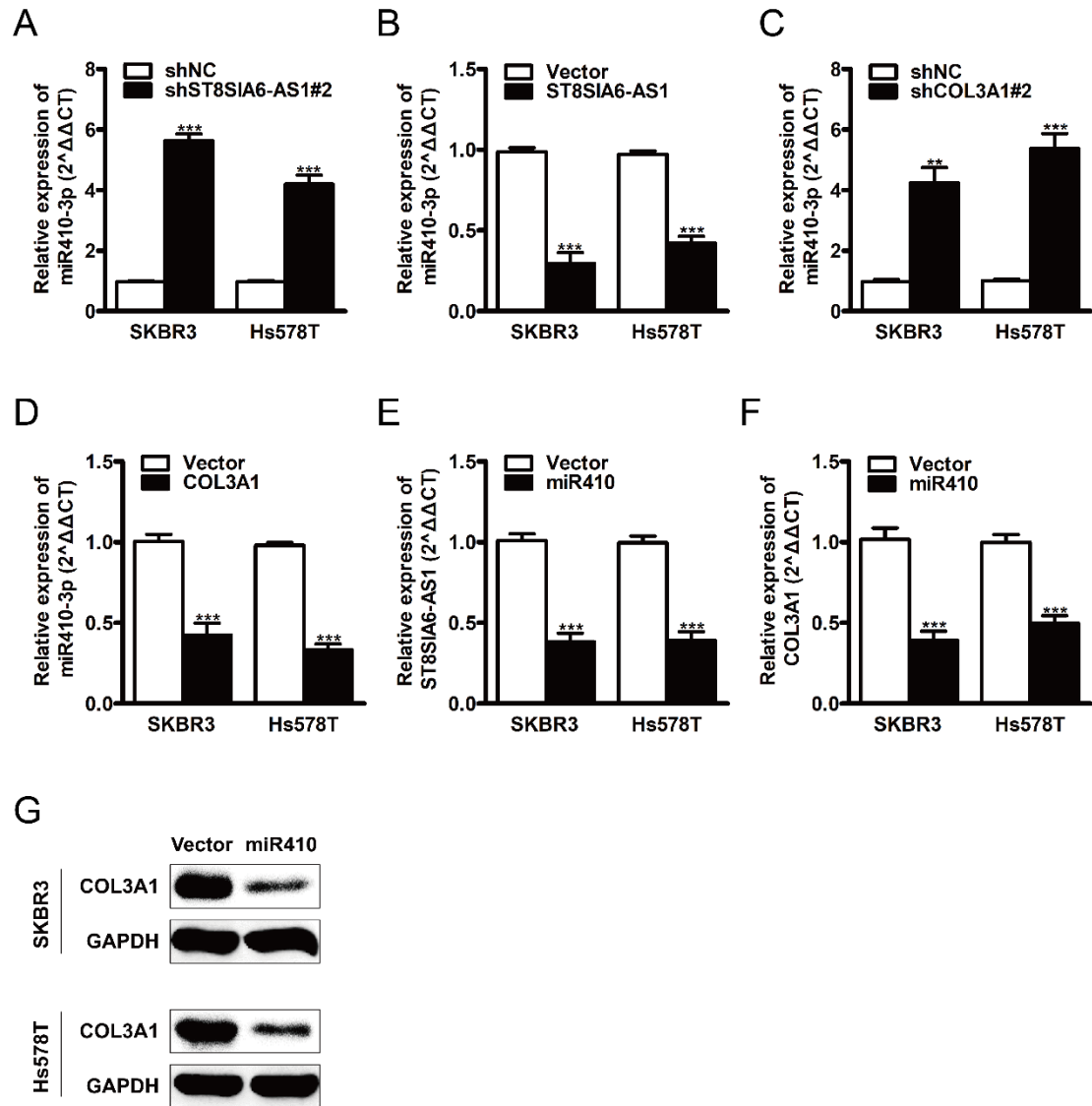


图 4.6 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 表达调控关系

A. ST8SIA6-AS1 敲低后 miR-410-3p 的表达水平检测；B. ST8SIA6-AS1 过表达后 miR-410-3p 的表达水平检测；C. COL3A1 敲低后 miR-410-3p 的表达水平检测；D. COL3A1 过表达后 miR-410-3p 的表达水平检测；E. miR-410 过表达后 ST8SIA6-AS1 的 mRNA 表达水平检测；F. miR-410 过表达后 COL3A1 的 mRNA 表达水平检测；G. miR-410 过表达后 COL3A1 的蛋白表达水平检测。

Figure 4.6 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 expression regulation relationship

A. Expression level of miR-410-3p after ST8SIA6-AS1 knockdown was detected; B. Detection of miR-410-3p expression level after ST8SIA6-AS1 overexpression; C. Detection of miR-410-3p expression level after COL3A1 knockdown; D. Detection of miR-410-3p expression level after

COL3A1 overexpression; E. Detection of mRNA expression level of ST8SIA6-AS1 after miR-410 overexpression; F. Detection of mRNA expression level of COL3A1 after miR-410 overexpression; G. Detection of protein expression level of COL3A1 after miR-410 overexpression.

为了进一步验证 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 是否能够调控 BCSCs 的干性维持, 设置回复实验: 空白对照组, 敲低 ST8SIA6-AS1 组, 敲低 ST8SIA6-AS1 组中同时转染 miR-410-3p inhibitor。结果如图 4.7 A 所示, 在 SKBR3 细胞中, 敲低 ST8SIA6-AS1 组表现出 COL3A1 mRNA 水平的下降, 然而在共转染 miR-410-3p inhibitor 后, 这一现象得到了回复。在 Hs578T 细胞中也观察到了同样的现象 (4.7 B)。WB 实验结果表明, 共转染 miR-410-3p inhibitor 后逆转了 COL3A1 蛋白的表达 (4.7 C)。同样的, 验证了干性标志物的蛋白表达, 如图 4.7 D 所示, c-Myc, Oct4, Nanog, Klf4 和 Sox2 的蛋白表达水平得到了不同程度的回复。紧接着, 通过干细胞悬浮成球实验得知, 相较于 ST8SIA6-AS1 敲低组, 共转染 miR-410-3p inhibitor 后干细胞悬浮球体的数量和大小得到显著上调 (4.7 E-F)。细胞克隆形成实验结果显示, 共转染 miR-410-3p inhibitor 后, ST8SIA6-AS1 敲低组的细胞克隆形成能力发生了显著的回升 (4.7 G-H)。最后发现, 细胞迁移能力也得到了显著上调 (4.7 I-J)。

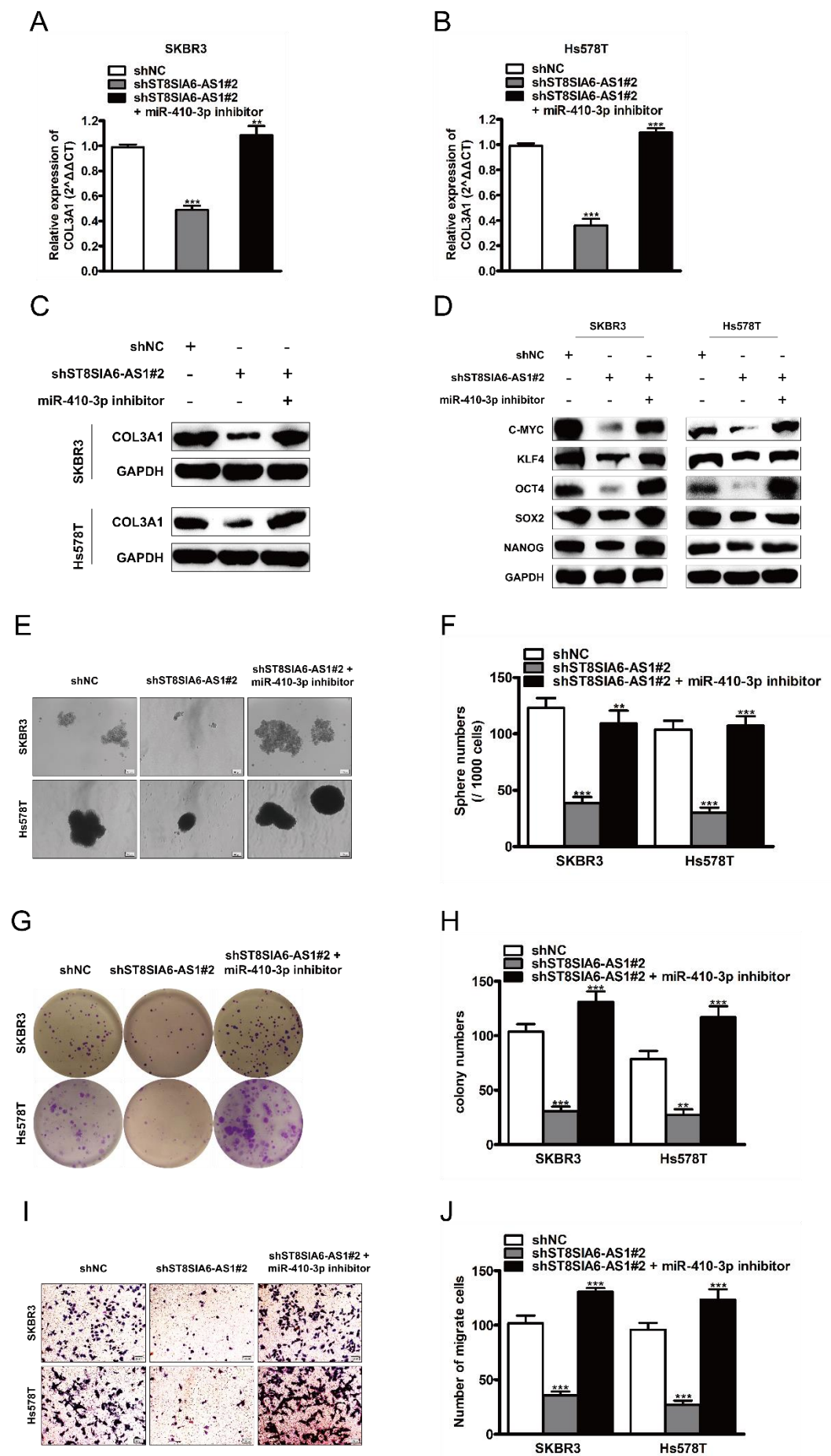


图 4.7 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 调控 BCSCs 干性维持

A. SKBR3 细胞中 COL3A1 的 mRNA 表达检测；B. Hs578T 细胞中 COL3A1 的 mRNA 表达检测；C. SKBR3 和 Hs578T 细胞中 COL3A1 蛋白表达水平检测；D. SKBR3 和 Hs578T 细胞中干性标志物蛋白表达水平检测；E-F. 悬浮干细胞球体数量检测及量化；G-H. SKBR3 和 Hs578T 细胞克隆形成数量的检测及量化；I-J. SKBR3 和 Hs578T 细胞迁移能力的检测及量化。

Figure 4.7 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 regulates stemness maintenance in BCSCs

A. mRNA expression assay of COL3A1 in SKBR3 cells; B. mRNA expression assay of COL3A1 in Hs578T cells; C. Detection of COL3A1 protein expression levels in SKBR3 and Hs578T cells; D. Stemness marker protein expression level assay in SKBR3 and Hs578T cells; E-F. Detection and quantification of the number of suspended stem cell spheroids; G-H. Detection and quantification of the number of clone formation in SKBR3 and Hs578T cells; I-J. Detection and quantification of the migration ability of SKBR3 and Hs578T cells.

接下来,通过裸鼠异种移植瘤模型在体内验证 lncRNA ST8SIA6-AS1 及其下游调控因子 miR-410-3p 及 COL3A1 的生长潜力。使用到的 SKBR3 细胞系有: SKBR3-shNC、SKBR3-ST8SIA6-AS1、SKBR3-shST8SIA6-AS1#2、SKBR3-COL3A1、SKBR3-shCOL3A1#2、SKBR3-miR410、SKBR3-ST8SIA6-AS1+shCOL3A1、SKBR3-shST8SIA6-AS1+COL3A1。结果如图 4.8 A 所示,过表达 ST8SIA6-AS1 组肿瘤生长状态良好,在体积上显著高于对照组;敲低 ST8SIA6-AS1 组,肿瘤生长较差,体积明显低于对照组,且远远低于过表达 ST8SIA6-AS1 组;同样的,过表达 COL3A1 组的肿瘤体积要显著高于对照组,且和过表达 ST8SIA6-AS1 组相差无几;敲低 COL3A1 组的肿瘤体积要明显低于对照组,且远远低于 COL3A1 过表达组,同时也远远低于 ST8SIA6-AS1 过表达组,和敲低 ST8SIA6-AS1 组差不多;过表达 miR-410 组的肿瘤体积明显小于对照组,远远小于过表达 ST8SIA6-AS1 组和过表达 COL3A1 组,却高于敲低 ST8SIA6-AS1 组和敲低 COL3A1 组;在过表达 ST8SIA6-AS1 细胞中敲低 COL3A1 后,细胞的体内生长情况要弱于过表达 ST8SIA6-AS1 组,同样的,在敲低 ST8SIA6-AS1 组细胞中过表达 COL3A1 后,细胞的体内生长情况要显著高于敲低 ST8SIA6-AS1 组。对取出的肿瘤组织进行分析天平称重后,得到跟上述一致的结果。过表达 ST8SIA6-AS1 组和过表达 COL3A1 组的肿瘤组织质量上调显著;敲低 ST8SIA6-AS1 组、敲低 COL3A1 组和过表达 miR-410 组的肿瘤组织质量降低显著;与 ST8SIA6-AS1 过表达组相比较,在 ST8SIA6-AS1 过表达的细胞中敲降 COL3A1

可以下调其体内生长状态，质量下降明显；同样的，与敲低 ST8SIA6-AS1 组相比较，在 ST8SIA6-AS1 敲低的细胞中过表达 COL3A1，可以显著恢复细胞在体内的生长，质量恢复明显，但要略低于 COL3A1 过表达组（图 4.8 B）。

以上实验结果表明，ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 可以在体内促进乳腺癌的增殖，而 miR-410-3p 则是抑制乳腺癌的体内增殖。

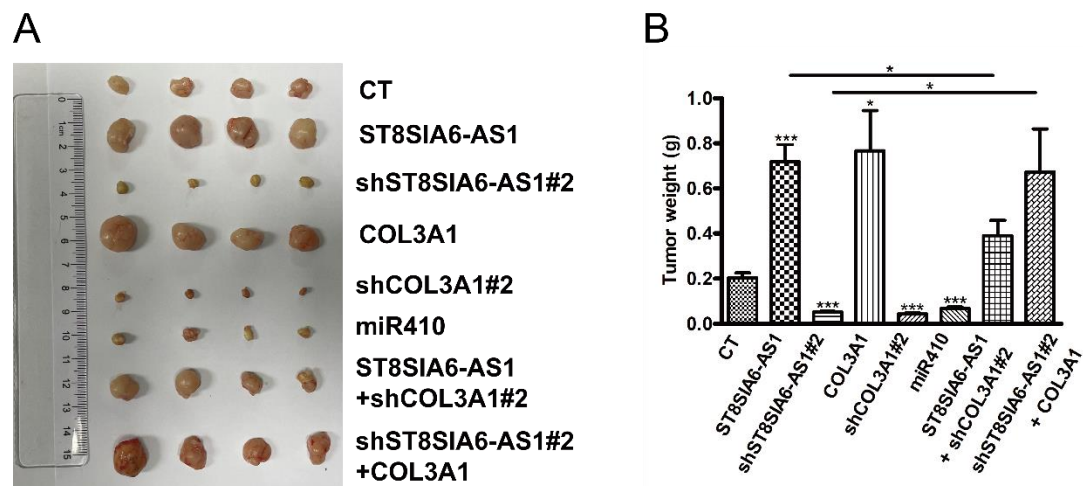


图 4.8 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 在动物水平调控乳腺癌增殖

A. SKBR3 细胞体内成瘤的组织展示；B. 肿瘤组织质量分析。

Figure 4.8 ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/ COL3A1 regulates breast cancer proliferation at the animal level

A. Tissue demonstration of tumorigenesis in SKBR3 cells in vivo; B. Tumor tissue quality analysis.

4.5 讨论

众多的研究报告显示，miR-410-3p 可以抑制癌症的发生进展，这表明 miR-410-3p 是一个显著的抑癌因子。在本节中，发现 miR-410-3p 在乳腺癌中的表达量下调，并且低表达 miR-410-3p 组的患者比高表达 miR-410-3p 组的患者预后更差，提示 miR-410-3p 可能抑制乳腺癌的发生发展。同样的，首先构建了稳定过表达 miR-410 的 SKBR3 和 Hs578T 细胞系，qRT-PCR 检测到 miR-410-3p 的表达量显著上升。CCK8 实验结果表明，过表达 miR-410 的细胞生长减弱；细胞迁移实验结果表明，过表达 miR-410 的细胞迁移效率降低，提示过表达 miR-410 可以影响乳腺癌的增殖和迁移。然后，为了探究过表达 miR-410 是否可以影响乳腺癌

干细胞的干性维持作用,检测了干性标志物的表达,qRT-PCR 和 WB 实验结果表明,在过表达 miR-410 后,干性标志物的表达显著下降;另外,干细胞球体形成实验表明,过表达 miR-410 后,细胞形成干细胞悬浮球体的数量和大小都发生了显著的下降;化疗药物抵抗实验表明,过表达 miR-410 后的细胞耐药能力明显减弱;克隆形成实验证明,敲低过表达 miR-410 的细胞克隆形成能力下降明显。至此,可以发现 miR-410-3p 可以抑制乳腺癌的增殖、迁移与干性特征的维持,表明 miR-410-3p 在乳腺癌中也是一个抑癌因子发挥功能。

另外,miR-410-3p 作为 ST8SIA6-AS1 的下游调控因子也得到了验证。发现,在 ST8SIA6-AS1 敲低或者过表达后,miR-410-3p 的 RNA 表达水平随之上调或者下降。同样的,在 COL3A1 敲低或者过表达后,miR-410-3p 的 RNA 表达水平也随之上调或者下降。当然,在 miR-410 过表达后,ST8SIA6-AS1 和 COL3A1 的表达也发生了显著的抑制。荧光素酶报告实验表明,miR-410-3p 可以特异性结合 ST8SIA6-AS1,也可以跟 COL3A1 的非编码区域发生结合,去抑制 COL3A1 的 mRNA 的表达水平。因此,发现 miR-410-3p 是 ST8SIA6-AS1 的下游调控因子,且是 COL3A1 的上游调控因子,可以初步断定,ST8SIA6-AS1、miR-410-3p、COL3A1 存在 ceRNA 网络调控轴关系。在后续的回复实验中,将进一步确认。

根据回复实验结果得知,在敲降 ST8SIA6-AS1 的细胞株中共转染 miR-410-3p 的抑制剂,发现 COL3A1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著下降,另外细胞的肿瘤干性特征也得到了显著的抑制,表现在干性标志物表达的下降,悬浮干细胞球体的数量和大小减弱,细胞克隆形成的能力的显著降低。在探讨体内成瘤实验时发现,过表达 ST8SIA6-AS1 和过表达 COL3A1 组的小鼠,SKBR3 细胞在体内生长状态良好,且肿瘤组织的质量显著上调,而敲低 ST8SIA6-AS1 组、敲低 COL3A1 组和过表达 miR-410 组的小鼠在体内生长状态较差,肿瘤组织的体积和质量下降。lncRNA ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 存在轴调控关系,且调控 BCSCs 干性特征的维持。

根据以上所有实验结果,可以得出结论,miR-410-3p 有可能作为乳腺癌的一个新的生物标志物,并且影响乳腺癌的增殖迁移和肿瘤干细胞干性的维持,同时还存在 lncRNA ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 轴调控关系,可以影响 BCSCs 的干性维持状态。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

乳腺癌肿瘤干细胞是导致乳腺癌异质性的一个重要原因,也是导致乳腺癌复发、转移和耐药的根本原因。以 lncRNA ST8SIA6-AS1 为出发点,探讨了 lncRNA 是否可以影响乳腺癌发生发展,并通过何种途径,哪些下游因子,去实现对乳腺癌的影响,得出以下结果:

(1) ST8SIA6-AS1 在乳腺癌患者中高表达,并与患者预后不良相关。稳定敲低 ST8SIA6-AS1 可以抑制乳腺癌的增殖和转移,并显著抑制 BCSCs 的干性特征,包括抑制干性标志物的表达,悬浮干细胞球体的减少,克隆形成能力的降低,细胞耐药能力下降。相反,过表达 ST8SIA6-AS1 得到完全相反的结果。

(2) COL3A1 在乳腺癌患者中高表达,且高表达 COL3A1 组的患者预后更差。稳定敲低 COL3A1 得到与稳定敲低 ST8SIA6-AS1 一样的结果,即抑制乳腺癌细胞增殖和迁移,抑制 BCSCs 的干性维持。同样的,过表达 COL3A1 得到相反的结果。而且, COL3A1 是 ST8SIA6-AS1 的下游调控因子。

(3) miR-410-3p 在乳腺癌中低表达,且低表达 miR-410-3p 组的患者预后更差。稳定过表达 miR-410 可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移,且抑制 BCSCs 的干性特征。

(4) miR-410-3p 可以和 ST8SIA6-AS1 特异性结合,抑制 ST8SIA6-AS1 的表达,也可以和 COL3A1 的非编码区特异性结合,抑制 COL3A1 表达。ST8SIA6-AS1/miR-410-3p/COL3A1 被证明存在轴调控关系,且调控 BCSCs 的干性维持。

综上所述,得到以下结论: ST8SIA6-AS1、miR-410-3p、COL3A1 三者分别有可能作为一个独立的因子,去作为乳腺癌的生物标志物,并且都能影响乳腺癌的发展,包括影响乳腺癌的增殖、迁移和干性维持。另外, miR-410-3p 即可以跟 ST8SIA6-AS1 特异性结合,抑制 ST8SIA6-AS1 表达,也可以靶向 COL3A1 的 3'UTR 抑制 COL3A1 的表达,整体来讲 ST8SIA6-AS1 竞争性结合 miR-410-3p 拮抗 miR-410-3p 对 COL3A1 表达的抑制。这些研究可以加深对乳腺癌发生发展的理解,也为乳腺癌的临床诊断和治疗提供可能的检测指标和药物靶点,并为此提供理论依据。

5.2 展望

到目前为止，癌症仍然是导致人类死亡的重要因素之一。尽管，随着治疗手段和技术的快速发展，但仍有很多癌症处于无法治愈的阶段，转移性乳腺癌就是其中之一。肿瘤干细胞是导致乳腺癌复发，转移和耐药的重要原因，因此探究更多的乳腺癌肿瘤干细胞的分子机制至关重要，该项工作对于开发新的药物和乳腺癌的治疗手段具有重要的理论意义。然而，当前对乳腺癌肿瘤干细胞的了解依然非常有限，许多问题依然存在且得不到更好的解释。

本研究取得了一定的实验结果，创新性的得出了 ST8SIA6-AS1 通过 miR-410-3p/COL3A1 轴调控 BCSCs 的结论，但也存在局限性，可以进一步探讨。比如，对于 ST8SIA6-AS1 的下游因子，是否还存在其它的 miRNA，可以表现出比 miR-410-3p 更好的效果。同样的，是否还存在其它的 mRNA，可以让 ST8SIA6-AS1 对乳腺癌的调控更加显著，对于乳腺癌肿瘤干细胞的调控也更加多样化，去激发更多的信号通路的探究。另外，lncRNA 调控癌症发生发展的作用方式是多样性的，是否可以探寻到其它更新的作用机制去解释其调控 BCSCs 的干性维持的过程。

随着科学技术高速的发展和乳腺癌研究的深入，可以相信，上述存在的问题终将会得到解释和解决。在未来的研究中，lncRNA ST8SIA6-AS1 在乳腺癌肿瘤干细胞中的机制会得到更多的验证，比如其是否会直接作用于某种蛋白质或者转录因子去参与 BCSCs 的调控过程，又或者通过影响某种蛋白的表达去参与到某种信号通路中参与 BCSCs 的调控过程，又或者通过跟肿瘤微环境中的免疫细胞相互作用去影响 BCSC 生存和发展等。同时，在以肿瘤干细胞为靶点的治疗手段中，是否可以使用新型材料或者药物去干扰 ST8SIA6-AS1 的表达，或者联合其它小分子药物增强治疗效果，为开发新的乳腺癌的治疗方案提供新的思路。

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] Bray F, Ferlay J, Laversanne M, et al. Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration [J]. International journal of cancer, 2015, 137(9): 2060-2071.
- [3] Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, et al. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? [J]. Journal of global oncology, 2018, 4: 1-16.
- [4] Torre L A, Siegel R L, Ward E M, et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update [J]. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2016, 25(1): 16-27.
- [5] Ginsburg O, Bray F, Coleman M P, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health [J]. Lancet (London, England), 2017, 389(10071): 847-860.
- [6] Allemani C, Weir H K, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. Lancet (London, England), 2015, 385(9972): 977-1010.
- [7] Denkert C, Liedtke C, Tutt A, et al. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies [J]. Lancet (London, England), 2017, 389(10087): 2430-2442.
- [8] Coates A S, Winer E P, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015 [J]. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2015, 26(8): 1533-1546.

- [9] Li C I, Daling J R, Malone K E. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998 [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2003, 21(1): 28-34.
- [10] Glass A G, Hoover R N. Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990, 82(8): 693-696.
- [11] Bigaard J, Stahlberg C, Jensen M B, et al. Breast cancer incidence by estrogen receptor status in Denmark from 1996 to 2007 [J]. Breast cancer research and treatment, 2012, 136(2): 559-564.
- [12] Dall G V, Britt K L. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk [J]. Frontiers in oncology, 2017, 7: 110.
- [13] Coughlin S S. Epidemiology of Breast Cancer in Women [J]. Advances in experimental medicine and biology, 2019, 1152: 9-29.
- [14] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 [J]. Science (New York, NY), 1994, 266(5182): 66-71.
- [15] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 [J]. Nature, 1995, 378(6559): 789-792.
- [16] Antoniou A, Pharoah P D, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies [J]. American journal of human genetics, 2003, 72(5): 1117-1130.
- [17] Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2007, 25(11): 1329-1333.
- [18] Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2013, 105(11): 812-822.
- [19] Easton D F, Pharoah P D, Antoniou A C, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk [J]. The New England journal of medicine, 2015, 372(23): 2243-2257.
- [20] Hwang S J, Lozano G, Amos C I, et al. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk [J]. American journal of human genetics, 2003, 72(4): 975-983.

- [21] Bubien V, Bonnet F, Brouste V, et al. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome [J]. Journal of medical genetics, 2013, 50(4): 255-263.
- [22] Tan M H, Mester J L, Ngeow J, et al. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2012, 18(2): 400-407.
- [23] Liaw D, Marsh D J, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome [J]. Nature genetics, 1997, 16(1): 64-67.
- [24] Hearle N, Schumacher V, Menko F H, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2006, 12(10): 3209-3215.
- [25] Pharoah P D, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families [J]. Gastroenterology, 2001, 121(6): 1348-1353.
- [26] Antoniou A C, Foulkes W D, Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2 [J]. The New England journal of medicine, 2014, 371(17): 1651-1652.
- [27] Heikkinen T, Kärkkäinen H, Aaltonen K, et al. The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009, 15(9): 3214-3222.
- [28] Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families [J]. Nature, 2007, 446(7133): 316-319.
- [29] CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies [J]. American journal of human genetics, 2004, 74(6): 1175-1182.
- [30] Weischer M, Nordestgaard B G, Pharoah P, et al. CHEK2*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2012, 30(35): 4308-4316.
- [31] Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles [J]. Nature genetics, 2006, 38(8): 873-875.

- [32] Thompson D, Duedal S, Kirner J, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97(11): 813-822.
- [33] Zhang G, Zeng Y, Liu Z, et al. Significant association between Nijmegen breakage syndrome 1 657del5 polymorphism and breast cancer risk [J]. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2013, 34(5): 2753-2757.
- [34] Michailidou K, Beesley J, Lindstrom S, et al. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer [J]. Nature genetics, 2015, 47(4): 373-380.
- [35] Mavaddat N, Pharoah P D, Michailidou K, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2015, 107(5).
- [36] Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes [J]. American journal of human genetics, 2019, 104(1): 21-34.
- [37] Morris D H, Jones M E, Schoemaker M J, et al. Secular trends in age at menarche in women in the UK born 1908-93: results from the Breakthrough Generations Study [J]. Paediatric and perinatal epidemiology, 2011, 25(4): 394-400.
- [38] Braithwaite D, Moore D H, Lustig R H, et al. Socioeconomic status in relation to early menarche among black and white girls [J]. Cancer causes & control : CCC, 2009, 20(5): 713-720.
- [39] Sisti J S, Collins L C, Beck A H, et al. Reproductive risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer: Results from the nurses' health studies [J]. International journal of cancer, 2016, 138(10): 2346-2356.
- [40] Reeves G K, Pirie K, Green J, et al. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis [J]. British journal of cancer, 2009, 100(3): 538-544.
- [41] McCormack V A, Dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis [J]. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2006, 15(6): 1159-1169.

- [42] Krishnan K, Baglietto L, Apicella C, et al. Mammographic density and risk of breast cancer by mode of detection and tumor size: a case-control study [J]. Breast cancer research : BCR, 2016, 18(1): 63.
- [43] Hopper J L. Odds per adjusted standard deviation: comparing strengths of associations for risk factors measured on different scales and across diseases and populations [J]. American journal of epidemiology, 2015, 182(10): 863-867.
- [44] Chen W Y, Rosner B, Hankinson S E, et al. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk [J]. Jama, 2011, 306(17): 1884-1890.
- [45] Allen N E, Beral V, Casabonne D, et al. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2009, 101(5): 296-305.
- [46] Hunter D J, Colditz G A, Hankinson S E, et al. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women [J]. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2010, 19(10): 2496-2502.
- [47] Althuis M D, Brogan D R, Coates R J, et al. Hormonal content and potency of oral contraceptives and breast cancer risk among young women [J]. British journal of cancer, 2003, 88(1): 50-57.
- [48] He C, Kraft P, Chasman D I, et al. A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause [J]. Human genetics, 2010, 128(5): 515-527.
- [49] Stone J, Dite G S, Gunasekara A, et al. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue [J]. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2006, 15(4): 612-617.
- [50] Stolk L, Perry J R, Chasman D I, et al. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways [J]. Nature genetics, 2012, 44(3): 260-268.
- [51] Waks A G, Winer E P. Breast Cancer Treatment: A Review [J]. Jama, 2019, 321(3): 288-300.

- [52] McDonald E S, Clark A S, Tchou J, et al. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer [J]. Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 2016, 57 Suppl 1: 9s-16s.
- [53] Fischer J P, Wes A M, Tuggle C T, et al. Mastectomy with or without immediate implant reconstruction has similar 30-day perioperative outcomes [J]. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS, 2014, 67(11): 1515-1522.
- [54] Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast [J]. The New England journal of medicine, 1981, 305(1): 6-11.
- [55] Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer [J]. Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990), 2017, 112(4): 413-417.
- [56] Martin M, Lopez-Tarruella S, Gilarranz Y J. Endocrine therapy for hormone treatment-naïve advanced breast cancer [J]. Breast (Edinburgh, Scotland), 2016, 28: 161-166.
- [57] Hassan M S, Ansari J, Spooner D, et al. Chemotherapy for breast cancer (Review) [J]. Oncology reports, 2010, 24(5): 1121-1131.
- [58] Sinclair S, Swain S M. Primary systemic chemotherapy for inflammatory breast cancer [J]. Cancer, 2010, 116(11 Suppl): 2821-2828.
- [59] Jerusalem G, Lancellotti P, Kim S B. HER2+ breast cancer treatment and cardiotoxicity: monitoring and management [J]. Breast cancer research and treatment, 2019, 177(2): 237-250.
- [60] Sugie T. Immunotherapy for metastatic breast cancer [J]. Chinese clinical oncology, 2018, 7(3): 28.
- [61] Keenan T E, Tolaney S M. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer [J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 2020, 18(4): 479-489.
- [62] Romano G, Veneziano D, Acunzo M, et al. Small non-coding RNA and cancer [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(5): 485-491.
- [63] Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer [J]. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2011, 32(3): 583-588.

- [64] Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, et al. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2013, 105(12): 849-859.
- [65] Levin A A. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides [J]. The New England journal of medicine, 2019, 380(1): 57-70.
- [66] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'riordan W D, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis [J]. The New England journal of medicine, 2018, 379(1): 11-21.
- [67] Beg M S, Brenner A J, Sachdev J, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors [J]. Investigational new drugs, 2017, 35(2): 180-188.
- [68] Iyer M K, Niknafs Y S, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. Nature genetics, 2015, 47(3): 199-208.
- [69] Ebisuya M, Yamamoto T, Nakajima M, et al. Ripples from neighbouring transcription [J]. Nature cell biology, 2008, 10(9): 1106-1113.
- [70] Ponjavic J, Oliver P L, Lunter G, et al. Genomic and transcriptional co-localization of protein-coding and long non-coding RNA pairs in the developing brain [J]. PLoS genetics, 2009, 5(8): e1000617.
- [71] Cabili M N, Trapnell C, Goff L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses [J]. Genes & development, 2011, 25(18): 1915-1927.
- [72] Anastasiadou E, Jacob L S, Slack F J. Non-coding RNA networks in cancer [J]. Nature reviews Cancer, 2018, 18(1): 5-18.
- [73] Prensner J R, Iyer M K, Sahu A, et al. The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex [J]. Nature genetics, 2013, 45(11): 1392-1398.
- [74] Hung T, Wang Y, Lin M F, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters [J]. Nature genetics, 2011, 43(7): 621-629.
- [75] Meredith E K, Balas M M, Sindy K, et al. An RNA matchmaker protein regulates the activity of the long noncoding RNA HOTAIR [J]. RNA (New York, NY), 2016, 22(7): 995-1010.
- [76] Clemson C M, Hutchinson J N, Sara S A, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles [J]. Molecular cell, 2009, 33(6): 717-726.

- [77] Ha M, Kim V N. Regulation of microRNA biogenesis [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2014, 15(8): 509-524.
- [78] Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(18): 7024-7029.
- [79] Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [80] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [81] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [82] Iorio M V, Croce C M. microRNA involvement in human cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1126-1133.
- [83] Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance [J]. *Cancer gene therapy*, 2010, 17(8): 523-531.
- [84] Clarke M F, Dick J E, Dirks P B, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells [J]. *Cancer research*, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [85] Bjerkvig R, Tysnes B B, Aboody K S, et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights [J]. *Nature reviews Cancer*, 2005, 5(11): 899-904.
- [86] Hill R P. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven [J]. *Cancer research*, 2006, 66(4): 1891-1895; discussion 1890.
- [87] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nature medicine*, 1997, 3(7): 730-737.
- [88] Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008, 22(10): 3696-3705.

- [89] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells [J]. *Nature*, 2010, 468(7325): 824-828.
- [90] Xiong Y Q, Sun H C, Zhang W, et al. Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, 15(15): 4838-4846.
- [91] Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. *Nature reviews Cancer*, 2002, 2(1): 48-58.
- [92] Singh S, Brocker C, Koppaka V, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress [J]. *Free radical biology & medicine*, 2013, 56: 89-101.
- [93] Miltenyi S, Müller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS [J]. *Cytometry*, 1990, 11(2): 231-238.
- [94] De Wynter E A, Coutinho L H, Pei X, et al. Comparison of purity and enrichment of CD34⁺ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems [J]. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 1995, 13(5): 524-532.
- [95] Moghbeli M, Moghbeli F, Forghanifard M M, et al. Cancer stem cell detection and isolation [J]. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 2014, 31(9): 69.
- [96] Pattabiraman D R, Weinberg R A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2014, 13(7): 497-512.
- [97] Moserle L, Ghisi M, Amadori A, et al. Side population and cancer stem cells: therapeutic implications [J]. *Cancer letters*, 2010, 288(1): 1-9.
- [98] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system [J]. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006, 24(3): 506-513.
- [99] Szotek P P, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos P T, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(30): 11154-11159.

- [100] Wang M, Wang Y, Zhong J. Side population cells and drug resistance in breast cancer [J]. *Molecular medicine reports*, 2015, 11(6): 4297-4302.
- [101] Ho M M, Ng A V, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells [J]. *Cancer research*, 2007, 67(10): 4827-4833.
- [102] Wang J, Guo L P, Chen L Z, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. *Cancer research*, 2007, 67(8): 3716-3724.
- [103] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2006, 44(1): 240-251.
- [104] Fang D, Nguyen T K, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. *Cancer research*, 2005, 65(20): 9328-9337.
- [105] Taylor M D, Poppleton H, Fuller C, et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma [J]. *Cancer cell*, 2005, 8(4): 323-335.
- [106] O'brien C A, Kreso A, Jamieson C H. Cancer stem cells and self-renewal [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, 16(12): 3113-3120.
- [107] Van Stijn A, Van Der Pol M A, Kok A, et al. Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2003, 88(5): 497-508.
- [108] Bhaskara V K, Mohanam I, Rao J S, et al. Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells [J]. *PloS one*, 2012, 7(2): e30905.
- [109] Rahimi K, Füchtbauer A C, Fathi F, et al. Isolation of cancer stem cells by selection for miR-302 expressing cells [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6635.
- [110] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [111] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 [J]. *Cell*, 1998, 95(3): 379-391.
- [112] Du Z, Jia D, Liu S, et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells [J]. *Glia*, 2009, 57(7): 724-733.

- [113] Murakami S, Ninomiya W, Sakamoto E, et al. SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2015, 33(9): 2652-2663.
- [114] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. Cancer research, 2005, 65(13): 5506-5511.
- [115] Rodriguez-Pinilla S M, Sarrio D, Moreno-Bueno G, et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer [J]. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 2007, 20(4): 474-481.
- [116] Hägerstrand D, He X, Bradic Lindh M, et al. Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile [J]. Neuro-oncology, 2011, 13(11): 1178-1191.
- [117] Gangemi R M, Griffero F, Marubbi D, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2009, 27(1): 40-48.
- [118] Ibrahim E E, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2012, 30(10): 2076-2087.
- [119] Lu Y, Zhu H, Shan H, et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells [J]. Cancer letters, 2013, 340(1): 113-123.
- [120] Bianchi F, Hu J, Pelosi G, et al. Lung cancers detected by screening with spiral computed tomography have a malignant phenotype when analyzed by cDNA microarray [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2004, 10(18 Pt 1): 6023-6028.
- [121] Li Q, Gao Y, Jia Z, et al. Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2012, 143(3): 799-810.e792.
- [122] Tang H, Zhu H, Wang X, et al. KLF4 is a tumor suppressor in anaplastic meningioma stem-like cells and human meningiomas [J]. Journal of molecular cell biology, 2017, 9(4): 315-324.

- [123] Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2003, 308(2): 251-256.
- [124] Foster K W, Ren S, Louro I D, et al. Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLF [J]. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research, 1999, 10(6): 423-434.
- [125] Riverso M, Montagnani V, Stecca B. KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth [J]. Oncogene, 2017, 36(23): 3322-3333.
- [126] Cartwright P, Mclean C, Sheppard A, et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism [J]. Development (Cambridge, England), 2005, 132(5): 885-896.
- [127] Pfister S, Remke M, Benner A, et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009, 27(10): 1627-1636.
- [128] Rickman D S, Schulte J H, Eilers M. The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors [J]. Cancer discovery, 2018, 8(2): 150-163.
- [129] Hirvonen H, Hukkanen V, Salmi T T, et al. L-myc and N-myc in hematopoietic malignancies [J]. Leukemia & lymphoma, 1993, 11(3-4): 197-205.
- [130] Galardi S, Savino M, Scagnoli F, et al. Resetting cancer stem cell regulatory nodes upon MYC inhibition [J]. EMBO reports, 2016, 17(12): 1872-1889.
- [131] Ellwood-Yen K, Graeber T G, Wongvipat J, et al. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors [J]. Cancer cell, 2003, 4(3): 223-238.
- [132] Giancotti F G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation [J]. Cell, 2013, 155(4): 750-764.
- [133] Wang Y, He L, Du Y, et al. The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling [J]. Cell stem cell, 2015, 16(4): 413-425.

- [134] Chai S, Ng K Y, Tong M, et al. Octamer 4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells [J]. *Hepatology* (Baltimore, Md), 2016, 64(6): 2062-2076.
- [135] Stylianou S, Clarke R B, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer [J]. *Cancer research*, 2006, 66(3): 1517-1525.
- [136] Harrison H, Farnie G, Howell S J, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor [J]. *Cancer research*, 2010, 70(2): 709-718.
- [137] Garcia-Heredia J M, Lucena-Cacace A, Verdugo-Sivianes E M, et al. The Cargo Protein MAP17 (PDZK1IP1) Regulates the Cancer Stem Cell Pool Activating the Notch Pathway by Abducting NUMB [J]. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2017, 23(14): 3871-3883.
- [138] Wang R, Li Y, Tsung A, et al. iNOS promotes CD24(+)CD133(+) liver cancer stem cell phenotype through a TACE/ADAM17-dependent Notch signaling pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(43): E10127-e10136.
- [139] Sahlgren C, Gustafsson M V, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(17): 6392-6397.
- [140] Xing F, Okuda H, Watabe M, et al. Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells [J]. *Oncogene*, 2011, 30(39): 4075-4086.
- [141] Xie M, Zhang L, He C S, et al. Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2012, 113(5): 1501-1513.
- [142] Zhou J, Wulfkuhle J, Zhang H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(41): 16158-16163.
- [143] Yang L, Dong Y, Li Y, et al. IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF- κ B/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer [J]. *International journal of cancer*, 2019, 145(4): 1099-1110.

- [144] Kim S Y, Kang J W, Song X, et al. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells [J]. Cellular signalling, 2013, 25(4): 961-969.
- [145] Almiron Bonnin D A, Havrda M C, Lee M C, et al. Secretion-mediated STAT3 activation promotes self-renewal of glioma stem-like cells during hypoxia [J]. Oncogene, 2018, 37(8): 1107-1118.
- [146] Gonzalez-Torres C, Gaytan-Cervantes J, Vazquez-Santillan K, et al. NF- κ B Participates in the Stem Cell Phenotype of Ovarian Cancer Cells [J]. Archives of medical research, 2017, 48(4): 343-351.
- [147] Wang D, Fu L, Sun H, et al. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice [J]. Gastroenterology, 2015, 149(7): 1884-1895.e1884.
- [148] Liu S, Zhang C, Zhang K, et al. FOXP3 inhibits cancer stem cell self-renewal via transcriptional repression of COX2 in colorectal cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 44694-44704.
- [149] Yang X, Ye J, Yan H, et al. MiR-491 attenuates cancer stem cells-like properties of hepatocellular carcinoma by inhibition of GIT-1/NF- κ B-mediated EMT [J]. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2016, 37(1): 201-209.
- [150] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells [J]. Cancer cell, 2007, 11(1): 69-82.
- [151] Beck B, Driessens G, Goossens S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours [J]. Nature, 2011, 478(7369): 399-403.
- [152] Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1 [J]. Cancer cell, 2013, 23(2): 171-185.
- [153] Wang R, ChadaLavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium [J]. Nature, 2010, 468(7325): 829-833.
- [154] Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth [J]. Nature medicine, 2001, 7(11): 1194-1201.
- [155] Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells [J]. Cancer cell, 2009, 15(6): 501-513.

- [156] Kim R J, Park J R, Roh K J, et al. High aldehyde dehydrogenase activity enhances stem cell features in breast cancer cells by activating hypoxia-inducible factor-2 α [J]. Cancer letters, 2013, 333(1): 18-31.
- [157] Heddleston J M, Li Z, McLendon R E, et al. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype [J]. Cell cycle (Georgetown, Tex), 2009, 8(20): 3274-3284.
- [158] Méndez O, Zavadil J, Esencay M, et al. Knock down of HIF-1 α in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres [J]. Molecular cancer, 2010, 9: 133.
- [159] Seidel S, Garvalov B K, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α [J]. Brain : a journal of neurology, 2010, 133(Pt 4): 983-995.
- [160] Civenni G, Malek A, Albino D, et al. RNAi-mediated silencing of Myc transcription inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in prostate cancer [J]. Cancer research, 2013, 73(22): 6816-6827.
- [161] Hao N B, Lü M H, Fan Y H, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors [J]. Clinical & developmental immunology, 2012, 2012: 948098.
- [162] Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination [J]. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association, 2016, 19(4): 1052-1065.
- [163] Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(30): 12425-12430.
- [164] Wu A, Wei J, Kong L Y, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia [J]. Neuro-oncology, 2010, 12(11): 1113-1125.
- [165] Yang J, Liao D, Chen C, et al. Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway [J]. Stem cells (Dayton, Ohio), 2013, 31(2): 248-258.

- [166] Fu X T, Dai Z, Song K, et al. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway [J]. International journal of oncology, 2015, 46(2): 587-596.
- [167] Scheel C, Eaton E N, Li S H, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast [J]. Cell, 2011, 145(6): 926-940.
- [168] Chen W J, Ho C C, Chang Y L, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling [J]. Nature communications, 2014, 5: 3472.
- [169] Mccuaig R, Wu F, Dunn J, et al. The biological and clinical significance of stromal-epithelial interactions in breast cancer [J]. Pathology, 2017, 49(2): 133-140.
- [170] Tsuyada A, Chow A, Wu J, et al. CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells [J]. Cancer research, 2012, 72(11): 2768-2779.
- [171] Lau E Y, Lo J, Cheng B Y, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling [J]. Cell reports, 2016, 15(6): 1175-1189.
- [172] Xiong S, Wang R, Chen Q, et al. Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling [J]. American journal of cancer research, 2018, 8(2): 302-316.
- [173] Schrader J, Gordon-Walker T T, Aucott R L, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2011, 53(4): 1192-1205.
- [174] Murai T. Lipid Raft-Mediated Regulation of Hyaluronan-CD44 Interactions in Inflammation and Cancer [J]. Frontiers in immunology, 2015, 6: 420.
- [175] Kessenbrock K, Dijkgraaf G J, Lawson D A, et al. A role for matrix metalloproteinases in regulating mammary stem cell function via the Wnt signaling pathway [J]. Cell stem cell, 2013, 13(3): 300-313.
- [176] Oskarsson T, Acharyya S, Zhang X H, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs [J]. Nature medicine, 2011, 17(7): 867-874.

- [177] Ghielmini M, Schmitz S F, Bürki K, et al. The effect of Rituximab on patients with follicular and mantle-cell lymphoma. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) [J]. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2000, 11 Suppl 1: 123-126.
- [178] Nabhan C, Patton D, Gordon L I, et al. A pilot trial of rituximab and alemtuzumab combination therapy in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) [J]. *Leukemia & lymphoma*, 2004, 45(11): 2269-2273.
- [179] Osta W A, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy [J]. *Cancer research*, 2004, 64(16): 5818-5824.
- [180] Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, et al. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients [J]. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2006, 42(15): 2530-2538.
- [181] Luistro L, He W, Smith M, et al. Preclinical profile of a potent gamma-secretase inhibitor targeting notch signaling with in vivo efficacy and pharmacodynamic properties [J]. *Cancer research*, 2009, 69(19): 7672-7680.
- [182] Tolcher A W, Messersmith W A, Mikulski S M, et al. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2012, 30(19): 2348-2353.
- [183] Strosberg J R, Yeatman T, Weber J, et al. A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer [J]. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2012, 48(7): 997-1003.
- [184] Kummar S, O'sullivan Coyne G, Do K T, et al. Clinical Activity of the γ -Secretase Inhibitor PF-03084014 in Adults With Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis) [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2017, 35(14): 1561-1569.
- [185] Cashen A, Lopez S, Gao F, et al. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma [J]. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 2008, 14(11): 1253-1261.

- [186] Galsky M D, Vogelzang N J, Conkling P, et al. A phase I trial of LY2510924, a CXCR4 peptide antagonist, in patients with advanced cancer [J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2014, 20(13): 3581-3588.
- [187] Sakamuri D, Glitza I C, Betancourt Cuellar S L, et al. Phase I Dose-Escalation Study of Anti-CTLA-4 Antibody Ipilimumab and Lenalidomide in Patients with Advanced Cancers [J]. Molecular cancer therapeutics, 2018, 17(3): 671-676.
- [188] Meindl-Beinker N M, Betge J, Gutting T, et al. A multicenter open-label phase II trial to evaluate nivolumab and ipilimumab for 2nd line therapy in elderly patients with advanced esophageal squamous cell cancer (RAMONA) [J]. BMC cancer, 2019, 19(1): 231.
- [189] Migden M R, Rischin D, Schmultz C D, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma [J]. The New England journal of medicine, 2018, 379(4): 341-351.
- [190] Motzer R J, Penkov K, Haanen J, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma [J]. The New England journal of medicine, 2019, 380(12): 1103-1115.
- [191] Fujiwara Y, Iguchi H, Yamamoto N, et al. Tolerability and efficacy of durvalumab in Japanese patients with advanced solid tumors [J]. Cancer science, 2019, 110(5): 1715-1723.
- [192] Sullivan R J, Hamid O, Gonzalez R, et al. Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF-mutated melanoma patients [J]. Nature medicine, 2019, 25(6): 929-935.
- [193] Bunch H. Gene regulation of mammalian long non-coding RNA [J]. Molecular genetics and genomics : MGG, 2018, 293(1): 1-15.
- [194] Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer [J]. Cancer science, 2018, 109(7): 2093-2100.
- [195] Jin Y, Feng S J, Qiu S, et al. LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2017, 21(14): 3176-3184.
- [196] Xia H, Liu Y, Wang Z, et al. Long Noncoding RNA HOTAIRM1 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-Like Cells Through Regulation of HOX

- Gene Expression [J]. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2020, 17(2): 754-764.
- [197] Kuai J, Zheng L, Yi X, et al. ST8SIA6-AS1 promotes the development of hepatocellular carcinoma cells through miR-338-3p/NONO Axis [J]. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 2021, 53(9): 1192-1200.
- [198] Li Y, Jiang A. ST8SIA6-AS1 promotes hepatocellular carcinoma by absorbing miR-5195-3p to regulate HOXB6 [J]. *Cancer biology & therapy*, 2020, 21(7): 647-655.
- [199] Fei Q, Song F, Jiang X, et al. LncRNA ST8SIA6-AS1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and resistance to apoptosis by targeting miR-4656/HDAC11 axis [J]. *Cancer cell international*, 2020, 20: 232.
- [200] Li Z, Zhang C, Zong X, et al. ST8SIA6-AS1 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Angiogenesis of Pituitary Adenoma [J]. *Journal of oncology*, 2022, 2022: 7960261.
- [201] He J, Yan H, Wei S, et al. LncRNA ST8SIA6-AS1 Promotes Cholangiocarcinoma Progression by Suppressing the miR-145-5p/MAL2 Axis [J]. *OncoTargets and therapy*, 2021, 14: 3209-3223.
- [202] Huang C M, Cao G Y, Yang C X, et al. LncRNA ST8SIA6-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating the miR-5195/PCBP2 axis [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2020, 24(8): 4203-4211.
- [203] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [204] Kreso A, Dick J E. Evolution of the cancer stem cell model [J]. *Cell stem cell*, 2014, 14(3): 275-291.
- [205] Adorno-Cruz V, Kibria G, Liu X, et al. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance [J]. *Cancer research*, 2015, 75(6): 924-929.
- [206] Qin Y, Hou Y, Liu S, et al. A Novel Long Non-Coding RNA lnc030 Maintains Breast Cancer Stem Cell Stemness by Stabilizing SQLE mRNA and Increasing Cholesterol Synthesis [J]. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 2021, 8(2): 2002232.

- [207] Wen S, Qin Y, Wang R, et al. A novel Lnc408 maintains breast cancer stem cell stemness by recruiting SP3 to suppress CBY1 transcription and increasing nuclear β -catenin levels [J]. *Cell death & disease*, 2021, 12(5): 437.
- [208] Zhu P, He F, Hou Y, et al. A novel hypoxic long noncoding RNA KB-1980E6.3 maintains breast cancer stem cell stemness via interacting with IGF2BP1 to facilitate c-Myc mRNA stability [J]. *Oncogene*, 2021, 40(9): 1609-1627.
- [209] Zheng A, Song X, Zhang L, et al. Long non-coding RNA LUCAT1/miR-5582-3p/TCF7L2 axis regulates breast cancer stemness via Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 2019, 38(1): 305.
- [210] Tang T, Guo C, Xia T, et al. LncCCAT1 Promotes Breast Cancer Stem Cell Function through Activating WNT/ β -catenin Signaling [J]. *Theranostics*, 2019, 9(24): 7384-7402.
- [211] Miller E J, Epstein E H, Jr., Piez K A. Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1971, 42(6): 1024-1029.
- [212] Prockop D J, Kivirikko K I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy [J]. *Annual review of biochemistry*, 1995, 64: 403-434.
- [213] Valkkila M, Melkonieni M, Kvist L, et al. Genomic organization of the human COL3A1 and COL5A2 genes: COL5A2 has evolved differently than the other minor fibrillar collagen genes [J]. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 2001, 20(5-6): 357-366.
- [214] Kontusaari S, Tromp G, Kuivaniemi H, et al. Substitution of aspartate for glycine 1018 in the type III procollagen (COL3A1) gene causes type IV Ehlers-Danlos syndrome: the mutated allele is present in most blood leukocytes of the asymptomatic and mosaic mother [J]. *American journal of human genetics*, 1992, 51(3): 497-507.
- [215] Duval E, Leclercq S, Elissalde J M, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes [J]. *Arthritis and rheumatism*, 2009, 60(10): 3038-3048.

- [216] Shaikh G, Zhang J, Perez-Aso M, et al. Adenosine A(2A) receptor promotes collagen type III synthesis via β -catenin activation in human dermal fibroblasts [J]. British journal of pharmacology, 2016, 173(23): 3279-3291.
- [217] Shen T, Gao K, Miao Y, et al. Exogenous growth factors enhance the expression of *cola1*, *cola3*, and Elastin in fibroblasts via activating MAPK signaling pathway [J]. Molecular and cellular biochemistry, 2018, 442(1-2): 203-210.
- [218] Mi Y, Wang W, Lu J, et al. Proteasome-mediated degradation of collagen III by cortisol in amnion fibroblasts [J]. Journal of molecular endocrinology, 2018, 60(2): 45-54.
- [219] Yuan B, Broadbent J A, Huan J, et al. The Effects of Adipose Stem Cell-Conditioned Media on Fibrogenesis of Dermal Fibroblasts Stimulated by Transforming Growth Factor- β 1 [J]. Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association, 2018, 39(1): 129-140.
- [220] Wang L, Sun Y, Guo Z, et al. COL3A1 Overexpression Associates with Poor Prognosis and Cisplatin Resistance in Lung Cancer [J]. Balkan medical journal, 2022, 39(6): 393-400.
- [221] Han S, Wang Z, Liu J, et al. miR-29a-3p-dependent COL3A1 and COL5A1 expression reduction assists sulforaphane to inhibit gastric cancer progression [J]. Biochemical pharmacology, 2021, 188: 114539.
- [222] Liu J, Li J, Su Y, et al. CircTMEM59 Serves as miR-410-3p Sponge to Inhibit the Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer by Regulating HOXD8 [J]. Biochemical genetics, 2022, 60(6): 2399-2415.
- [223] Jia G, Liang C, Li W, et al. MiR-410-3p facilitates Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by targeting Smad7 [J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 119-127.
- [224] Zhu L, Ni Z, Liang K, et al. The mechanism of miR-410-3p and miR-34c in nasopharyngeal carcinoma development and progression [J]. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 2021, 67(2): 114-120.
- [225] Ma Z H, Shi P D, Wan B S. MiR-410-3p activates the NF- κ B pathway by targeting ZCCHC10 to promote migration, invasion and EMT of colorectal cancer [J]. Cytokine, 2021, 140: 155433.

附录 3 缩略语对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
BCSCs	breast cancer stem cells	乳腺癌干细胞
BRCA	Breast invasive carcinoma	乳腺癌
lncRNA	long non-coding RNA	长链非编码 RNA
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
CCK8	Cell Counting Kit-8	细胞活力检测试剂盒-8
IARC	International Agency for Research on Cancer	国际癌症研究机构
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer	三阴性乳腺癌
CDH1	Cadherin 1	上皮钙粘蛋白
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
PR	Progesterone receptor	孕激素受体
Ki-67	Ki-67 Proliferation Marker Protein	增殖标记蛋白 Ki-67
CHEK2	Checkpoint Kinase 2	检查点激酶 2
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	人表皮生长因子受体 2
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms	单核苷酸多态性
STK11	Serine/Threonine Protein Kinase 11	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 11
NBN	Nibrin	尼布林
PALB2	Partner and localizer of BRCA2	BRCA2 的伴侣和定位子
PRS	Polygenic Risk Score	多基因风险评分
ncRNA	non-coding RNA	非编码 RNA
MHT	Menopausal hormone therapy	绝经期激素治疗
RBP	RNA binding proteins	RNA 结合蛋白
CSCs	Cancer Stem Cells	肿瘤干细胞
TICs	Tumor Initiating Cells	肿瘤起始细胞
ECs	Endothelial cells	血管内皮细胞
ABC	ATP-binding cassette	ATP 结合盒
ALDH	Aldehyde dehydrogenase	醛脱氢酶

FACS	Fluorescence-activated cell sorting	荧光激活细胞分选
MACS	Magnetic activated cell sorting	磁珠激活细胞分选
SP	side population	侧群细胞
EGF	Epithelial growth factor	上皮生长因子
FGF	Fibroblast Growth Factor	碱性成纤维细胞生长因子
LDA	Limited dilution assay	有限稀释试验
bHLH	Basic helix-loop-helix	基本螺旋-环-螺旋
NF- κ B	Nuclearfactor kappa-B	核因子- κ B
PGE2	Prostaglandin E2	前列腺素 E2
PI3K	Phosphatidyl inositide 3-kinases	磷酸肌醇 3-激酶
TME	Tumor microenvironment	肿瘤微环境
HGF	Hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子
TAMs	tumor-associated macrophages	肿瘤相关巨噬细胞
CCL17	C-C motif chemokine ligand 17	C 趋化因子配体 17
mAbs	Monoclonal antibody	单克隆抗体
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	慢性淋巴细胞白血病
GSI	γ -secretase inhibitor	分泌酶抑制剂
vEDS	Vascular Ehlers-Danlos Syndrome	血管型埃勒斯-丹洛斯综合征
TGF	Transforming Growth Factor	转化生长因子
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
OS	Overall Survival	总体生存率
DFS	Disease Free Survival	无病生存率
DMFS	Distant Metastasis-Free Survival	无远处转移的生存率
LSCs	Leukemia stem cells	白血病干细胞
rRNA	Ribosomal RNA	核糖体 RNA
tRNA	transfer ribonucleic acid	转运核糖核酸
ceRNA	competitive endogenous RNA	竞争性内源性 RNA
SCID	server combined immune deficiency	重度联合免疫缺陷
ESCs	Embryonic stem cell	胚胎干细胞
HOX	Homeobox	同源异形盒
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	PDZK1 相互作用的蛋白 1
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
HIFs	hypoxia inducible factors	缺氧诱导因子
IL-1	Interleukin-1	白细胞介素-1

TNF- α	tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	上皮细胞-间充质转化
CAFs	cancer-associated fibroblasts	癌症相关成纤维细胞
TGF- β	transforming growth factor- β	转化生长因子- β
MMPs	Matrix metalloproteinases	基质金属蛋白酶
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
HA	Hyaluronic acid	透明质酸
TN-C	Tenascin C	肌腱蛋白 C
FL	follicular lymphoma	滤泡性淋巴瘤
MCL	mantle cell lymphoma	套细胞淋巴瘤
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule	上皮细胞粘附分子
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	C-X-C 基序趋化因子受体 4
MM	multiple myeloma	多发性骨髓瘤
NHL	Non-Hodgkin's lymphoma	非霍奇金淋巴瘤
IC	immune checkpoint	免疫检查点
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4
PD-1	Programmed Cell Death 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed Cell Death-Ligand 1	程序性死亡受体-配体 1
ST8SIA6-AS1	ST8SIA6 antisense RNA 1	ST8 α -N-乙酰-神经氨酸 α -2,8-丙二酰转移酶 6 反义 RNA 1
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
CRC	Colorectal Cancer	结直肠癌

附录 4 质粒图谱

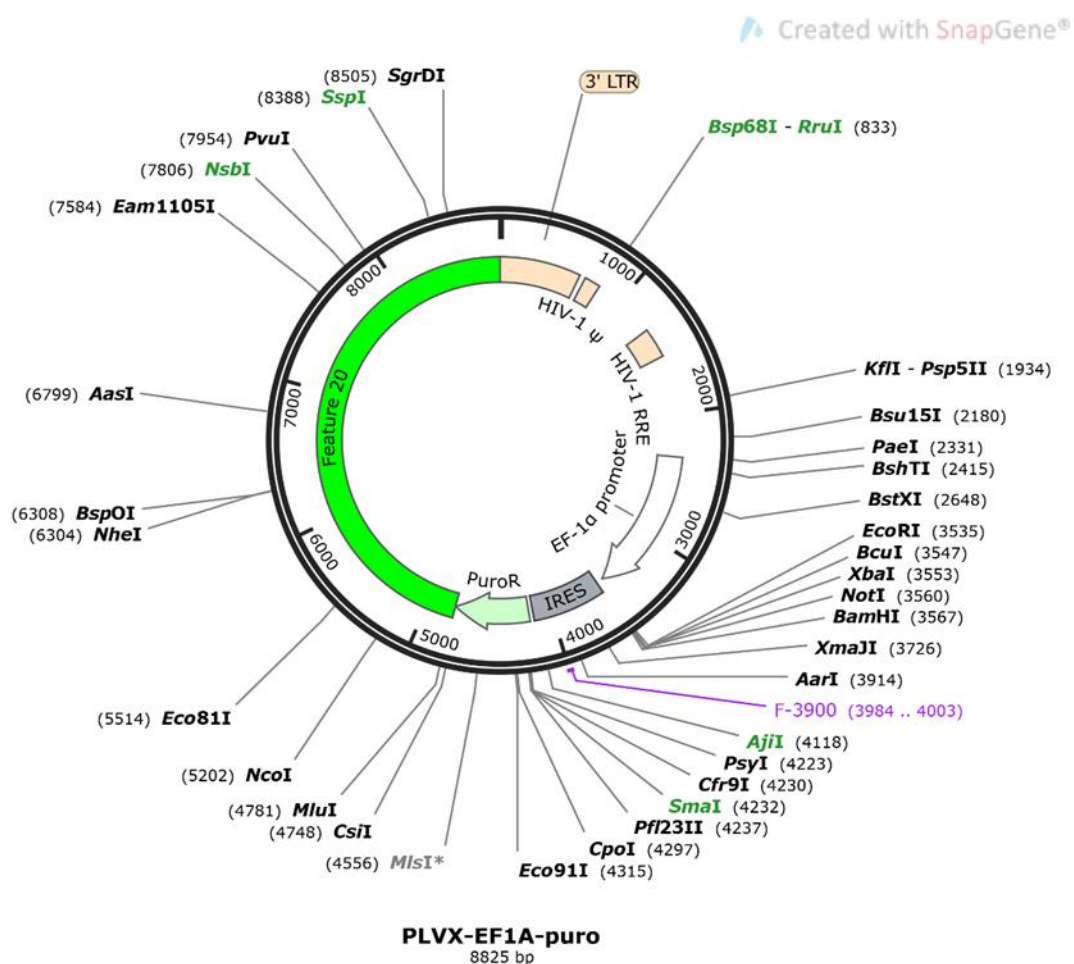


图 1 PLVX-EF1A-Puro 质粒图谱

Figure 1 Plasmid map of PLVX-EF1A-Puro



Figure 2 Plasmid map of pLKO.1-Puro



Figure 3 Plasmid map of GAG-POL

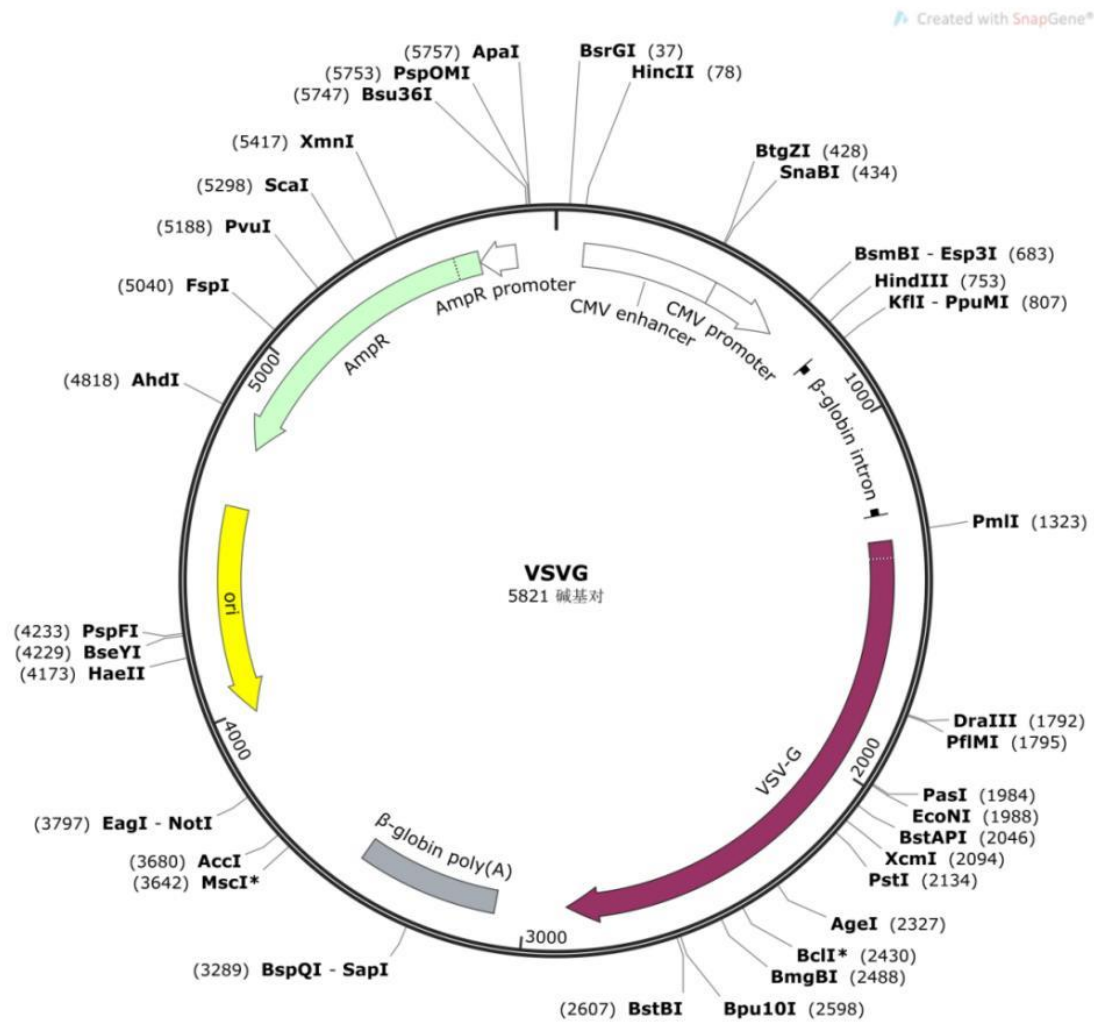


图 4 VSVG 质粒图谱

Figure 4 Plasmid map of VSVG

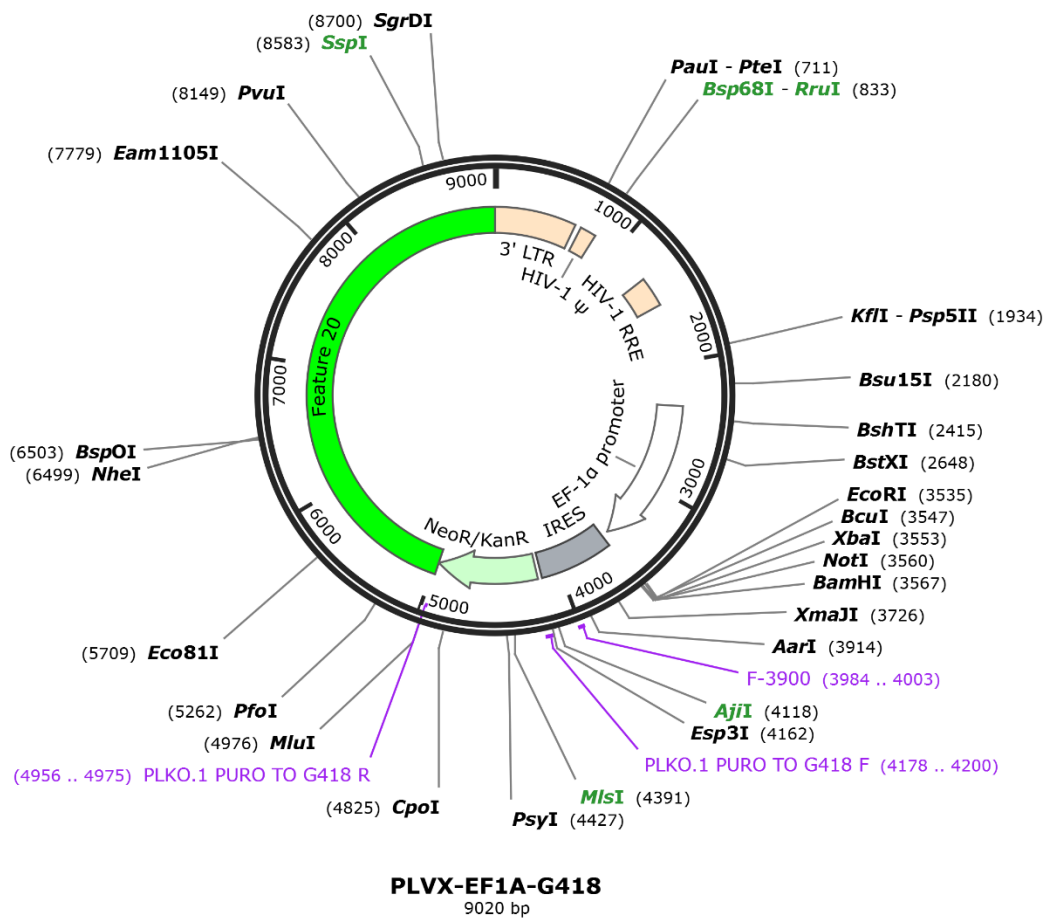


图 5 PLVX-EF1A-G418 质粒图谱

Figure 5 Plasmid map of PLVX-EF1A-G418

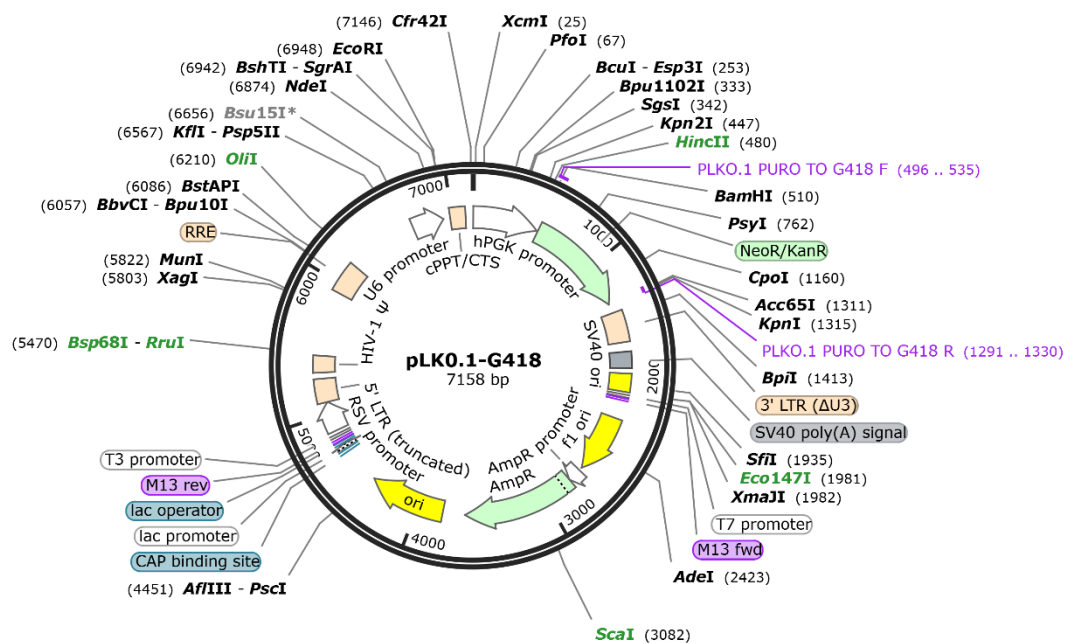


图 6 pLKO.1-G418 质粒图谱

Figure 6 Plasmid map of pLKO.1-G418

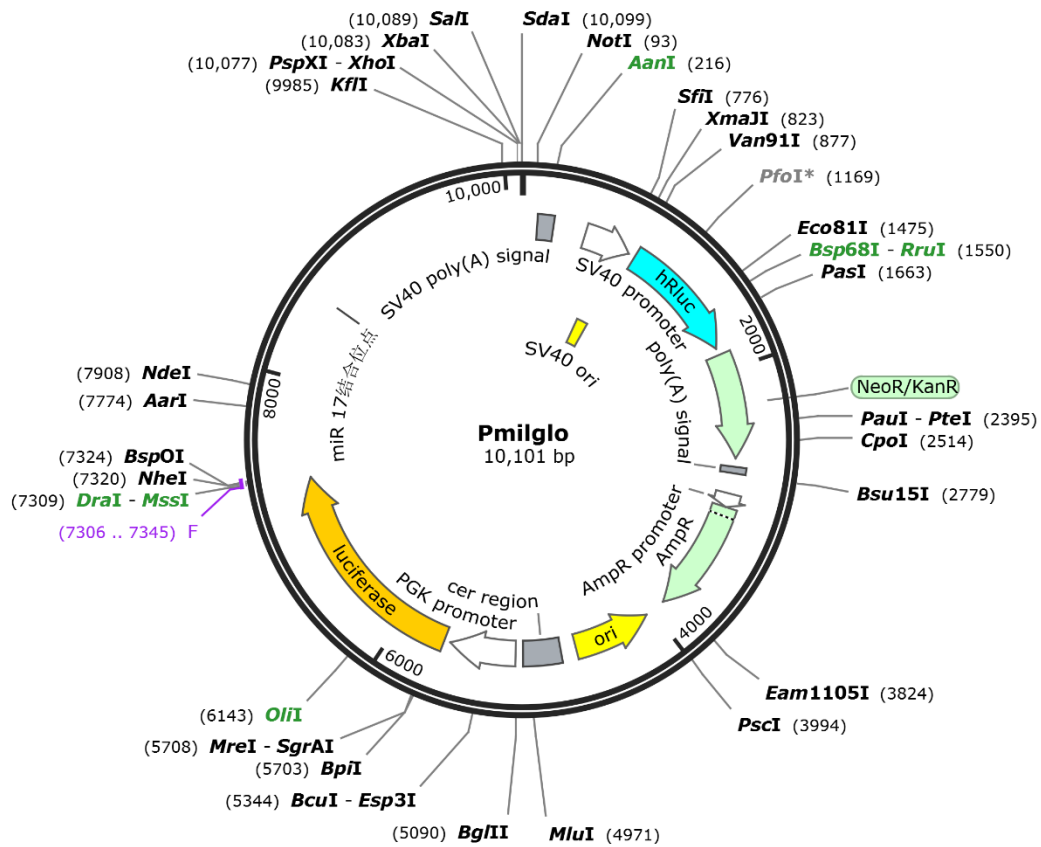


图 7 Pmilglo 质粒图谱

Figure 7 Plasmid map of Pmilglo