

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.05.005

LINC01694 通过调节 miR-128-3p/TERF1 轴对前列腺癌细胞恶性生物学行为的影响

郑明¹, 柯红燕², 陈忠军¹ (1. 荆州市中心医院 泌尿外科, 湖北 荆州 434020; 2. 荆州市中心医院 输血科, 湖北 荆州 434020)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA 01694(LINC01694)调节 miR-128-3p/端粒重复结合因子1(TERF1)轴对前列腺癌(PC)细胞恶性生物学行为的影响。**方法:** 收集2023年1月至2024年1月间在荆州市中心医院泌尿外科手术切除的20例PC组织及相应癌旁组织, 常规培养人PC细胞PC-3、DU145、LNCaP、C4-2和正常人前列腺上皮细胞RWPE-1。用Lipo6000™转染试剂将sh-LINC01694、sh-NC、miR-128-3p inhibitor、inhibitor-NC、miR-128-3p mimics、pcDNA和pcDNA-LINC01694转染LNCaP细胞, 分为Ctrl、sh-NC、sh-LINC01694、sh-LINC01694 + NC inhibitor、sh-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor、pcDNA和pcDNA LINC01694组。用qPCR法检测PC组织和细胞, 以及各组LNCaP细胞中LINC01694、miR-128-3p和TERF1 mRNA的表达, WB法检测各组LNCaP细胞中TERF1、caspase-3、cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin蛋白的表达, 克隆形成实验、流式细胞术和Transwell小室实验分别检测各组LNCaP细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 以及细胞凋亡情况。双萤光素酶报告基因实验、RNA pull-down实验和RNA免疫共沉淀(RIP)实验验证LINC01694与miR-128-3p和TERF1与miR-128-3p的靶向结合关系。裸鼠LNCaP细胞移植瘤实验检测敲减LINC01694对其移植瘤生长的影响。**结果:** LINC01694在PC组织、细胞中呈高表达(均 $P < 0.05$), 在LNCaP细胞中敲减LINC01694可促进miR-128-3p、caspase-3、E-cadherin蛋白的表达, 抑制LINC01694、TERF1、cyclin D1、N-cadherin蛋白的表达, 抑制LNCaP细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并促进其凋亡(均 $P < 0.05$), 这些作用均可被miR-128-3p inhibitor部分逆转(均 $P < 0.05$)。LINC01694可直接与miR-128-3p结合($P < 0.05$), miR-128-3p可直接与TERF1 mRNA结合($P < 0.05$), 说明LINC01694可调控miR-128-3p/TERF1轴。敲减LINC01694可明显抑制裸鼠LNCaP细胞移植瘤的生长($P < 0.05$)。**结论:** LINC01694通过调节miR-128-3p/TERF1轴抑制LNCaP细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 长链非编码RNA 01694; miR-128-3p; 端粒重复结合因子1; 前列腺癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.2; R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)05-0484-08

LINC01694 regulates the malignant biological behaviors of prostate cancer cells through the miR-128-3p/TERF1 axis

ZHENG Ming¹, KE Hongyan², CHEN Zhongjun¹ (1. Department of Urology, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, Hubei, China; 2. Department of Blood Transfusion, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of long non-coding RNA 01694 (LINC01694) regulating the microRNA-128-3p (miR-128-3p)/telomeric repeat binding factor 1 (TERF1) axis on the malignant biological behaviors of prostate cancer (PC) cells. **Methods:** Cancer tissues and corresponding adjacent tissues from 20 PC patients undergoing surgery at the Department of Urology, Jingzhou Central Hospital, between January 2023 and January 2024 were collected. Human PC cell lines (PC-3, DU145, LNCaP, C4-2) and normal human prostate epithelial RWPE-1 cells were routinely cultured. LNCaP cells were transfected with sh-LINC01694, sh-NC, miR-128-3p inhibitor, inhibitor-NC, miR-128-3p mimics, pcDNA, and pcDNA-LINC01694 using Lipo6000™ transfection reagent. Cells were divided into the following groups: Ctrl, sh-NC, sh-LINC01694, sh-LINC01694 + NC inhibitor, sh-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor, pcDNA, and pcDNA LINC01694 groups. The mRNA expression of LINC01694, miR-128-3p, and TERF1 in PC tissues and cells, as well as LNCaP cells in each group, was detected by qPCR. The protein expression of TERF1, caspase-3, cyclin D1, E-cadherin, and N-cadherin in LNCaP cells of each group was detected by WB method. Clone formation assay, flow cytometry, and Transwell chamber assay were applied to detect proliferation, apoptosis, migration, and invasion of LNCaP cells, respectively. Dual luciferase reporter gene assay, RNA pull-down assay, and RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) assay were applied to verify the

[基金项目] 湖北省卫生健康委员会资助项目(No. WJ2019Q020)

[作者简介] 郑明(1987—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事泌尿系统常见疾病的基础与临床的研究

[通信作者] 郑明(扫码获取作者联系方式)



targeting binding relationship between LINC01694 and miR-128-3p as well as between TERF1 and miR-128-3p. Nude mouse LNCaP cell xenograft experiment was conducted to assess the effect of LINC01694 knockdown on tumor growth. **Results:** LINC01694 was highly expressed in PC tissues and cells (all $P < 0.05$). Knockdown of LINC01694 in LNCaP cells promoted the protein expression of miR-128-3p, caspase-3, and E-cadherin, inhibited the protein expression of LINC01694, TERF1, cyclin D1, and N-cadherin, reduced cell proliferation, migration, and invasion, and promoted apoptosis (all $P < 0.05$). All these effects were partially reversed by the miR-128-3p inhibitor (all $P < 0.05$). LINC01694 could directly bind to miR-128-3p ($P < 0.05$), while miR-128-3p could directly bind to TERF1 mRNA ($P < 0.05$), indicating that LINC01694 regulates the miR-128-3p/TERF1 axis. Knockdown of LINC01694 significantly inhibited the growth of LNCaP cell xenografts in nude mice ($P < 0.05$). **Conclusion:** LINC01694 regulates the malignant biological behaviors of LNCaP cells through the miR-128-3p/TERF1 axis.

[Key words] long non-coding RNA 01694 (LINC01694); microRNA-128-3p; telomeric repeat binding factor 1 (TERF1); prostate cancer; proliferation; apoptosis; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(5): 484-491. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.05.005]

前列腺癌 (prostate cancer, PC) 是全球上第二癌症类型,也是全球男性人口病死的第五大原因,PC 的危险因素包括家族史、肥胖、年龄和种族。PC 的主要治疗方法包括放射治疗、手术、化疗和激素治疗。然而,手术和放疗对转移性肿瘤无效,激素治疗对雄激素不敏感/去势抵抗性癌症无效,化疗的不良反应可能严重损害患者的生活质量^[1-2]。所以研究 PC 发生发展的分子机制,对于 PC 的治疗具有重要意义。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一种超过 200 个核苷酸的非编码转录本,在细胞增殖、血管生成和转移等多种病理过程中发挥作用,尤其在肿瘤的发生发展中起着重要作用^[3-4]。LINC01694 是位于人类染色体 21q22.3 上的 lncRNA 成员,有研究^[5]发现,下调 LINC01694 表达可以抑制胆囊癌细胞的增殖和侵袭,加速胆囊癌细胞的凋亡。但其在 PC 中的作用此前未见报道。miRNA 是一类小的非编码 RNA,参与几乎所有生物途径的调控。靶向肿瘤代谢分子的肿瘤抑制性 miRNA 在癌症中经常下调,因此,miRNA 可以作为潜在的肿瘤生物标志物^[6]。Starbase 数据库预测发现,miR-370-3p、miR-340-5p、miR-338-3p、miR-128-3p、miR-302a-3p、miR-302b-3p 等均为 LINC01694 的下游 miRNA,已有研究^[7]表明,敲低 miR-128-3p 可以促进 PC 细胞的增殖、侵袭和 EMT 进程。故本研究选择 miR-128-3p 作为 LINC01694 的下游靶点。端粒功能障碍是癌症的标志之一,端粒重复序列结合因子 1 (telomeric repeat binding factor 1, TERF1) 是端粒维持所必需的基因,有研究^[8]表明,几种癌症与其功能障碍有关,如 TERF1 的增强或上调与局限性 PC 的预后不良相关。所以 TERF1 可作为治疗 PC 的生物标志物。Starbase 数据库分析显示,miR-128-3p 与 TERF1 存在结合位点。本研究旨在探讨 LINC01694 通过调控 miR-128-3p/TERF1 轴对 PC 细胞恶性生物学行为的影响,以期 PC 治疗提供实验依据和潜在的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 动物、PC 组织、细胞与主要试剂

收集 2023 年 1 月至 2024 年 1 月间在荆州市中心医院泌尿外科手术切除的 20 例 PC 患者的癌组织和癌旁组织。所有标本均经病理诊断,并按 WHO 标准进行分类。本研究方案获医院伦理委员会的批准 (No. 202212003)。所有患者均充分知情并签署了知情同意书。

10 只雄性 BALB/c 裸鼠,4 周龄购自湖北贝恩特生物科技有限公司 [(许可证号: SCXK(鄂)2021-0027)]。动物实验在湖北贝恩特生物科技有限公司进行,本研究获湖北贝恩特生物科技有限公司动物伦理委员会审核批准 (No. 2022A012)。

人 PC 细胞 PC-3、DU145、LNCaP、C4-2 和正常人前列腺上皮细胞 RWPE-1 均购自上海细胞库。sh-LINC01694、miR-128-3p inhibitor、miR-128-3p mimics 及其阴性对照质粒均由山东维真生物提供, Lipo6000™ 转染试剂、兔抗 TERF1、caspase-3、cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin 均购自碧云天生物技术有限公司,双萤光素酶报告基因检测试剂盒购自 MCE 公司, RNA pull-down 试剂盒、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RNA-binding protein immunoprecipitation, RIP) 检测试剂盒购自武汉金开瑞生物工程有限公司。QuantStudio™5 实时荧光定量 PCR 系统购自美国 Thermo 公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

将 PC-3、DU145、LNCaP、C4-2 细胞和 RWPE-1 细胞进行常规培养。将 LNCaP 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中,当细胞汇合度达约 80% 时用 Lipo6000™ 转染试剂将 si-NC、si-LINC01694、inhibitor-NC 和 miR-128-3p inhibitor 转染至 LNCaP 细胞,分为 Ctrl 组 (不转染)、si-NC 组 (转染 si-NC)、si-LINC01694 组 (转染 si-LINC01694)、si-LINC01694 + inhibitor-NC 组 (共转染 si-LINC01694 和 inhibitor-NC) 和 si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组 (共转

染 si-LINC01694 和 miR-128-3p inhibitor), 培养 4 h 后, 在培养皿中加入 3 μ L 聚苯乙烯和 1 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM。24 h 后, 用 2~3 mL 的完全培养液替换培养基。48 h 后收集细胞进行后续实验。将 LINC01694 过表达质粒 (pcDNA-LINC01694) 及其对照质粒 pcDNA 转染至 LNCaP 细胞, 分为 pcDNA 和 pcDNA-LINC01694 组, 48 h 后收集细胞用 qPCR 法检测 miR-128-3p 水平。

1.3 qPCR 法检测各组 LNCaP 细胞中 LINC01694、miR-128-3p 和 TERF1 mRNA 的表达

用 TRIzol® 试剂提取 PC 组织、细胞中的总 RNA, 用 PrimeScript™ 试剂盒将其逆转录为 cDNA, 用 qPCR 法对各样本的 cDNA 进行扩增, PCR 反应参数: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 60 s: 60 $^{\circ}$ C 60 s, 共 38 个循环。以 U6 或 GAPDH 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 LINC01694、miR-128-3p 和 TERF1 mRNA 的相对表达水平。LINC01694 正向引物为 5'-AAACGTCGCCTTCATCCACC-3', 反向引物为 5'-CTGACCAACGGCTTCCTGAC-3'; miR-128-3p 正向引物为 5'-GGTCACAGTGAACCGGTC-3', 反向引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 正向引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 反向引物为 5'-CGC TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3', 反向引物为 5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'; TERF1 正向引物为 5'-GTCTCTGTGCCGAGCCTTC-3', 反向引物为 5'-TCAATTGGTAAGCTGTAAGTCTGTG-3'。

1.4 WB 法检测各组 LNCaP 细胞中 TERF1、caspase-3、cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液裂解各组 LNCaP 细胞, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。提取的总蛋白经 SDS-PAGE 分离, 转膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 然后加入兔抗 TERF1、caspase-3、cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin 抗体 (稀释比例均为 1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜, 再加入相应二抗室温下处理 2 h, ECL 显色液曝光、蛋白凝胶成像系统成像, 用 Image J 软件分析各种蛋白的相对表达水平。

1.5 克隆形成实验检测各组 LNCaP 细胞的增殖能力

将转染后的 LNCaP 细胞以 10^3 个/孔接种于到 6 孔板中, 连续培养 2 周后, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 1% 结晶紫染色 15 min, 然后显微镜下观察细胞克隆形成情况, 计数并拍照。

1.6 流式细胞术检测各组 LNCaP 细胞的凋亡情况

将转染后的 LNCaP 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次后, 制成单细胞悬浮 (1×10^6 个细胞/mL)。按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒的步骤处理

细胞, 然后用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

1.7 Transwell 小室实验检测各组 LNCaP 细胞的迁移和侵袭能力

将转染 48 h 的 LNCaP 细胞制成悬液 (4×10^4 个/mL)。将 200 μ L 的 LNCaP 细胞悬液加到 Transwell 小室上层 (细胞侵袭实验时包被 Matrigel 基质胶), 下室中加入 600 μ L 10% 胎牛血清的培养基, 培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.5% 结晶紫染色 10 min, 最后在显微镜下对 5 个随机视野中的细胞进行观察、统计迁移和侵袭的细胞。

1.8 双萤光素酶报告基因实验验证 LINC01694 与 miR-128-3p 和 TERF1 与 miR-128-3p 的靶向关系

基于预测的靶向结合位点, 构建了 LINC01694 和 TERF1 的野生型和突变型质粒。随后, 将 LINC01694 和 TERF1 野生型片段 (LINC01694-WT 和 TERF1-WT)、LINC01694 和 TERF1 突变型片段 (LINC01694-MUT 和 TERF1-MUT) 连接到双萤光素酶载体上。随后, 将 miR-128-3p mimics 或 miR-NC 与构建的载体共转染于 LNCaP 细胞。培养 48 h 后, 使用双萤光素酶报告基因检测系统检测萤光素酶活性。

1.9 RNA pull-down 实验检测 miR-128-3p 与 LINC01694 或 TERF1 的结合关系

根据 RNA pull-down 试剂盒提供的方案, 收获 PC 细胞 LNCaP。随后, 用 500 μ L 的 IP 裂解缓冲液在冰上裂解 30 min, 然后超声 4 min。细胞裂解液在 4 $^{\circ}$ C、16 000 \times g 下离心 10 min 得到上清液。将生物素化 miR-128-3p 或 NC 磁珠与 LNCaP 细胞裂解上清液混合在 4 $^{\circ}$ C 下处理 2 h。随后, 用磁支架收集蛋白质/RNA-RNA-磁珠。最后提取 RNA 进行 qRT-PCR 分析。

1.10 RIP 实验验证 LINC01694 与 miR-128-3p 和 miR-128-3p 与 TERF1 mRNA 的结合关系

收集 1×10^7 个 LNCaP 细胞, 用冷 PBS 洗涤 1 次, 加入 400 μ L RIP 裂解缓冲液在冰浴上处理 30 min, 将细胞裂解液在 4 $^{\circ}$ C 下 16 000 \times g 离心 10 min 获得上清液。然后, 30 μ L 蛋白 A/G 磁珠在 100 μ L RIP 洗涤缓冲液中重悬, 与 5 μ g Ago2 抗体 (1:50) 或 IgG 抗体 (1:100) 室温下处理 30 min。抗体-磁珠复合物分别与 900 μ L、150 μ L RIP 免疫沉淀缓冲液和细胞上清液混合, 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜。用磁架用收集磁珠-抗体-抗原复合物。最后提取 RNA 进行 qRT-PCR 分析。

1.11 裸鼠 LNCaP 细胞移植瘤实验检测敲减 LINC01694 对其移植瘤生长的影响

收集稳定表达 si-NC 或 si-LINC01694 的 LNCaP 细胞制成细胞悬液, 分别将 1×10^6 个细胞注射到 BALB/c 裸鼠侧腹皮下。饲养 4 周, 每周测量裸鼠肿瘤体积, 四周后安乐死, 收集移植瘤组织并测量其质

量和体积。用 qPCR 和 WB 法检测裸鼠移植瘤组织中 miR-128-3p、TERF1 蛋白相对表达水平。

1.12 统计学处理

用 SPSS22.0 软件对实验数据进行统计学分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC01694 在 PC 组织、细胞中呈高表达

qPCR 法检测结果显示, 与癌旁组织 (1.02 ± 0.05) 比较, PC 组织 (3.95 ± 0.39) 中 LINC01694 呈高表达 ($P < 0.001$); 与 RWPE-1 细胞 (1.03 ± 0.02) 比较, PC-3 (3.15 ± 0.31)、DU145 (4.02 ± 0.40)、LNCaP (7.03 ± 0.70)、C4-2 细胞 (4.85 ± 0.48) 中 LINC01694 呈高表达 (均 $P < 0.05$), 其中 LNCaP 细胞中 LINC01694 表达水平最高, 选用 LNCaP 细胞进行后续实验。

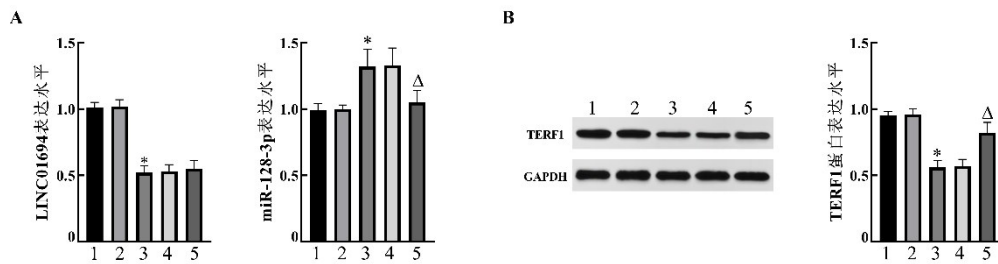
2.2 在 LNCaP 细胞中敲减 LINC01694 可促进 miR-128-3p、抑制 TERF1 蛋白的表达而抑制 miR-128-3p

则可逆转此作用

qPCR 法检测结果 (图 1A) 显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组 LNCaP 细胞中 miR-128-3p 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$), LINC01694 表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组中 miR-128-3p 表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。WB 法检测结果 (图 1B) 显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组 LNCaP 细胞中 TERF1 蛋白表达水平明显下降 (均 $P < 0.05$); 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组中 LNCaP 细胞中 TERF1 表达水平上调 ($P < 0.05$)。

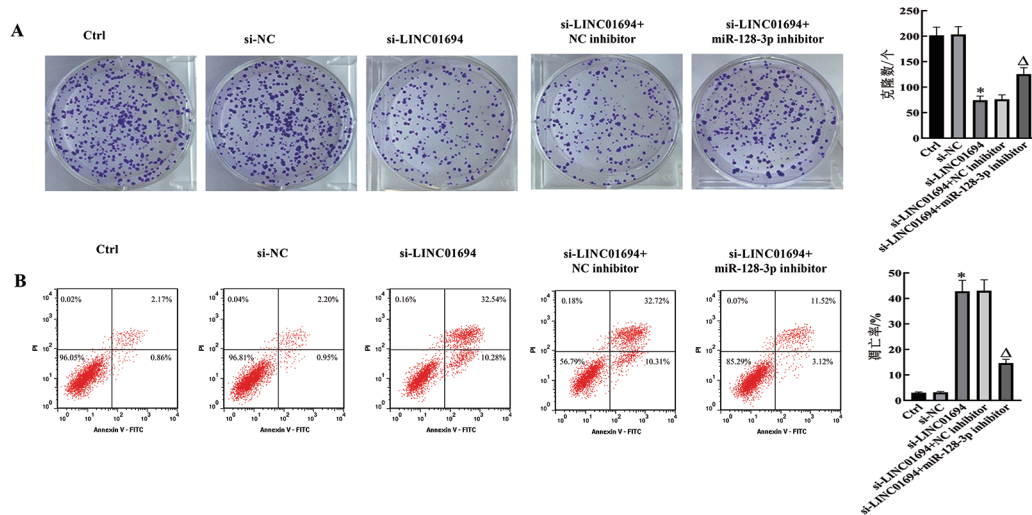
2.3 敲减 LINC01694 可明显抑制 LNCaP 细胞的增殖能力并促进其凋亡抑制 miR-128-3p 则可逆转此作用

克隆形成实验和流式细胞术检测结果 (图 2) 显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组 LNCaP 细胞克隆形成数明显减少, 凋亡率明显增加 (均 $P < 0.05$); 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组 LNCaP 细胞克隆形成数明显增多, 凋亡率明显下降 (均 $P < 0.05$)。



1: Ctrl 组; 2: si-NC 组; 3: si-LINC01694 组; 4: si-LINC01694 + inhibitor-NC; 5: si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor。与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图1 敲减 LINC01694 对 miR-128-3p(A)和 TERF1(B)表达的影响



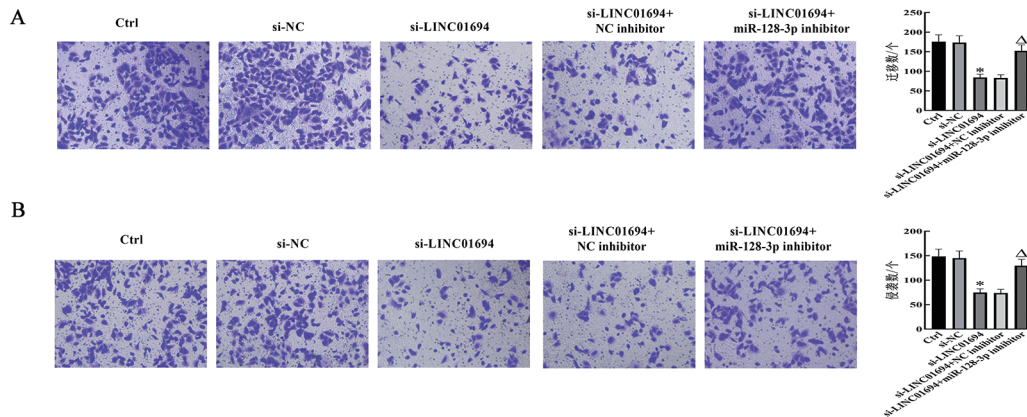
与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 si-LINC01694 + NC inhibitor 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图2 敲减 LINC01694 对 LNCaP 细胞增殖(A)、凋亡(B)的影响

2.4 敲减 LINC01694 可明显抑制 LNCaP 细胞的迁移、侵袭能力而抑制 miR-128-3p 则可逆转此作用

Transwell 小室实验检测结果(图 3)显示,与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组 LNCaP 细胞的迁移、侵

袭能力明显下降(均 $P < 0.05$); 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组 LNCaP 细胞的迁移、侵袭能力明显升高(均 $P < 0.05$)。



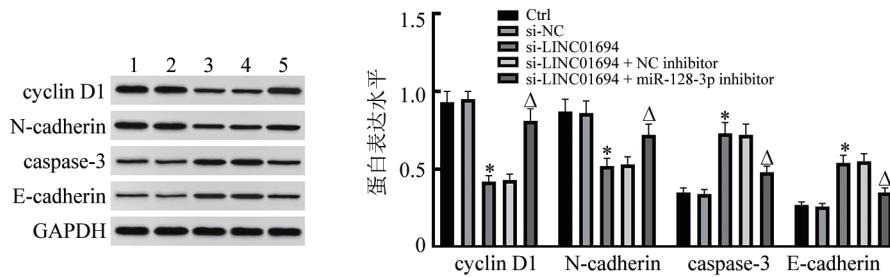
与 si-NC 组比较, $^*P < 0.05$, 与 si-LINC01694 + NC inhibitor 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 3 沉默 LINC01694 对 LNCaP 细胞迁移(A)和侵袭(B)的影响

2.5 敲减 LINC01694 可明显抑制 cyclin D1、N-cadherin 蛋白表达促进 caspase-3、E-cadherin 蛋白表达而抑制 miR-128-3p 则可逆转此作用

WB 法检测结果(图 4)显示,与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组 LNCaP 细胞中 cyclin D1、N-cadherin 蛋白表达水平明显下降(均 $P < 0.05$), caspase-3、

E-cadherin 蛋白表达水平明显升高上调(均 $P < 0.05$); 与 si-LINC01694 + inhibitor-NC 组比较, si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor 组中 LNCaP 细胞中 cyclin D1、N-cadherin 表达水平明显升高(均 $P < 0.05$), caspase-3、E-cadherin 表达水平明显下降(均 $P < 0.05$)。



1:Ctrl; 2:si-NC; 3:si-LINC01694; 4:si-LINC01694 + NC inhibitor; 5:si-LINC01694 + miR-128-3p inhibitor

与 si-NC 组比较, $^*P < 0.05$, 与 si-LINC01694 + NC inhibitor 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 4 沉默 LINC01694 对 LNCaP 细胞增殖、凋亡、EMT 相关蛋白表达的影响

2.6 LINC01694 靶向调控 miR-128-3p/TERF1 轴

Starbase 数据库分析结果(图 5A)显示, miR-128-3p 和 LINC01694 或 TERF1 存在相互作用结合位点。双萤光素酶报告基因实验检测结果(图 5B)显示,与 miR-NC + LINC01694-WT 或 miR-NC + TERF1-WT 组比较, miR-128-3p mimics + LINC01694-WT 或 miR-128-3p mimics + TERF1-WT 组 LNCaP 细胞中萤光素酶活性均显著下降(均 $P < 0.05$), 与 miR-NC + LINC01694-MUT 或 miR-NC + TERF1-MUT 组比较, miR-128-3p mimics + LINC01694-MUT 或 miR-128-3p

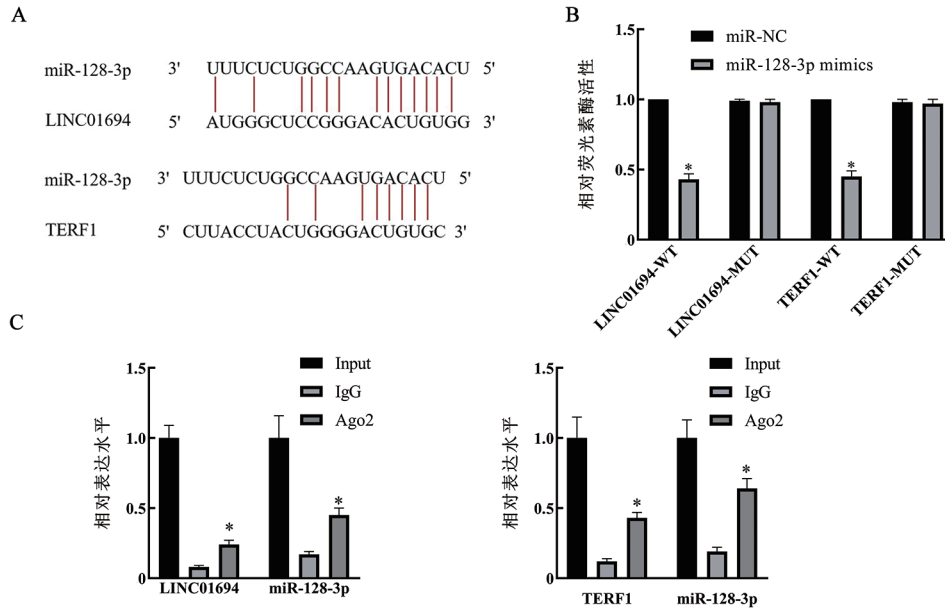
mimics + TERF1-MUT 组 LNCaP 细胞中萤光素酶活性均无明显变化。实验结果说明, miR-128-3p 与 LINC01694 或 TERF1 mRNA 之间存在靶向结合关系。

RNA pull-down 测定结果显示,与 Biotin-NC 组相比, Biotin-miR-128-3p 组中 LINC01694 [$(2.34 \pm 0.21$ vs 1.00 ± 0.08 , $t = 14.606$, $P < 0.05$), TERF1 mRNA [$(1.98 \pm 0.34$ vs 1.00 ± 0.04 , $t = 7.012$, $P < 0.05$)] 特异性富集。

RIP 分析结果结果(图 5C)显示,与 IgG 组比较,

Ago2 抗体组中高度富集 LINC01694 和 miR-128-3p 和 miR-128-3p 与 TERF1。qPCR 法检测结果显示, 与 pcDNA 组比较, pcDNA-LINC01694 组 LINC01694 表达 (1.42 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.08 , $t = 6.740$, $P < 0.05$) 明

显升高, miR-128-3p 表达 (0.36 ± 0.04 vs 0.99 ± 0.07 , $t = 19.141$, $P < 0.05$) 明显下降。实验结果说明, LINC01694 靶向负向调控 miR-128-3p 表达, 而 TERF1 又是 miR-128-3p 的靶标。



与 miR-NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 IgG 组比较, * $P < 0.05$ 。

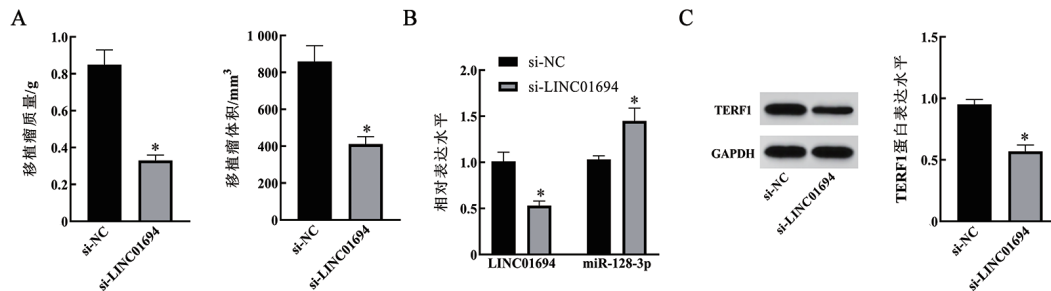
A: 生物学分析 miR-128-3p 和 LINC01694、TERF1 相互作用结合位点; B: 双荧光素酶活性结果分析; C: RIP 实验结果分析

图 5 LINC01694 靶向调控 miR-128-3p/TERF1 轴

2.7 敲减 LINC01694 可明显抑制裸鼠 LNCaP 细胞移植瘤的生长

裸鼠 LNCaP 细胞移植瘤实验检测结果 (图 6A) 显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组移植瘤质量、体积均明显下降 ($P < 0.05$), WB 法和 qPCR 法检测结

果 (图 6B、C) 显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC01694 组移植瘤组织中 miR-128-3p 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), LINC01694、TERF1 蛋白表达水平均明显下降 (均 $P < 0.05$)。



与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 6 沉默 LINC01694 对裸鼠移植瘤生长 (A) 及移植瘤组织中 miR-128-3p (B)、TERF1 (C) 表达的影响

3 讨论

在全球男性中 PC 具有较高的发病率和病死率^[9]。导致 PC 患者病死的两个最常见原因是去势抵抗或远处转移^[10]。PC 的发生发展机制复杂, PC 组织具有明显的异质性^[11]。目前, 根治性切除术、放疗和

化疗是治疗 PC 的主要治疗策略^[12]。但是, PC 发病率和病死率仍然呈不断上升的趋势, 因此其发病机制的研究具有重大意义^[13]。

lncRNA 参与了各种疾病的进展, 特别是作为重要的肿瘤基因调控因子, 影响肿瘤的生物行为、转录调控和转录后调控^[14]。有报道^[15]称, lncRNA 参与了肿

瘤的迁移、增殖、凋亡、转移和其他生物学过程。例如,二氢丹参酮I可以通过下调LINC01694表达诱导胆囊癌细胞SGC-996凋亡,抑制增殖、EMT进程和糖酵解作用^[16]。这与本研究结果一致。本研究中,LINC01694在PC细胞和组织中呈高表达,敲减LINC01694可明显抑制LNCaP细胞的增殖、迁移和侵袭能力,促进其凋亡,抑制其EMT进程,在体抑制移植瘤的生长,表明敲减LINC01694表达可以发挥抗PC的作用。

miRNA可调控多种肿瘤的发生和发展。新近研究^[17]发现,血清miR-128-3p在多种恶性肿瘤中表达异常,在许多疾病中发挥作用。赵海龙等^[18]研究发现,下调miR-128-3p可增加HNRNPL和PD-L1表达,抑制敲减NEAT1对非小细胞癌细胞增殖、凋亡及CD8⁺T细胞活化的影响;ZHANG等^[19]发现,lncRNAOIP5-AS1通过调节miR-128-3p/SLC7A11信号通路,抑制慢性镉暴露下的铁死亡,从而促进PC细胞的增殖、迁移能力;敲减TUG1可通过调节miR-128-3p/YES1轴延缓PC细胞的体外进展和体内肿瘤生长^[20]。这些研究均表明,miR-128-3p在治疗PC中起到重要作用,与本研究一致。本研究发现,敲减LINC01694表达可上调miR-128-3p表达,说明LINC01694负向调控miR-128-3p的表达,抑制miR-128-3p可逆转敲减LINC01694对LNCaP细胞恶性生物学行为的抑制作用。

TERF1是一种重要的端粒结合蛋白,TERF1在端粒长度调控中起关键作用,在阻止端粒融合和端粒区域复制中起重要作用。它负向调控端粒长度,过表达可导致端粒长度逐渐缩短^[21]。对哺乳动物细胞端粒DNA的保护和维持至关重要。TERF1在许多类型的癌症中作为肿瘤抑制基因,成为癌症诊断的潜在标志。例如,TERF1可作为miR-155靶点,敲减TERF1可促进PC细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制凋亡^[22]。本研究发现,敲减LINC01694可上调miR-128-3p表达,抑制TERF1蛋白的表达,说明miR-128-3p可负向调节TERF1的表达,从而抑制LNCaP细胞增殖、迁移和侵袭能力,促进其凋亡,抑制移植瘤的生长。

综上所述,LINC01694可以通过调节miR-128-3p/TERF1轴抑制PC细胞恶性生物学行为。本研究还不完善,LINC01694调节PC细胞凋亡和迁移、侵袭的分子机制以及LINC01694调节miR-128-3p/TERF1轴的作用机制还需要深入研究。

[参考文献]

- TERMINI D, DEN HARTOGH D J, JAGLANIAN A, *et al.* Curcumin against prostate cancer: current evidence[J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1536[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33182828/>. DOI:10.3390/biom10111536.
- SEKHOACHA M, RIET K, MOTLOUNG P, *et al.* Prostate cancer review: genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches[J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5730[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36080493/>. DOI: 10.3390/molecules27175730.
- MATTICK J S, AMARAL P P, CARNINCI P, *et al.* Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(6): 430-447. DOI:10.1038/s41580-022-00566-8.
- JOHN LIU S, DANG H X, LIM D A, *et al.* Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7): 446-460. DOI: 10.1038/s41568-021-00353-1.
- LIU L, YAN Y X, ZHANG G Y, *et al.* Knockdown of LINC01694 inhibits growth of gallbladder cancer cells *via* miR-340-5p/Sox4 [J/OL]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20194444[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32270853/>. DOI:10.1042/BSR20194444.
- RUGGIERI F, JONAS K, FERRACIN M, *et al.* microRNAs as regulators of tumor metabolism[J/OL]. *Endocr Relat Cancer*, 2023, 30(8): e220267[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37224081/>. DOI:10.1530/ERC-22-0267.
- LI S M, WANG Y, CAO Q D, *et al.* GLIDR promotes the aggressiveness progression of prostate cancer cells by sponging miR-128-3p[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2023, 242: 154343[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36709726/>. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154343.
- DOS SANTOS G A, VIANA N I, PIMENTA R, *et al.* Prognostic value of TERF1 expression in prostate cancer[J/OL]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2021, 33(1): 24[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34486082/>. DOI:10.1186/s43046-021-00082-4.
- XIA C F, DONG X S, LI H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590. DOI:10.1097/CM9.0000000000002108.
- SHIOTA M, BLAS L, KOBAYASHI S, *et al.* Predictive factors of survival outcomes in first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Int J Urol*, 2022, 29(1): 26-32. DOI: 10.1111/iju.14702.
- HAFFNER M C, ZWART W, ROUDIER M P, *et al.* Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2021, 18(2): 79-92. DOI:10.1038/s41585-020-00400-w.
- ALBERTSEN P C. Prostate cancer screening and treatment: where have we come from and where are we going?[J]. *BJU Int*, 2020, 126(2): 218-224. DOI:10.1111/bju.15153.
- 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. DOI:10.3322/caac.21660.
- AHMAD M, WEISWALD L B, POULAIN L, *et al.* Involvement of lncRNAs in cancer cells migration, invasion and metastasis: cytoskeleton and ECM crosstalk[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1):173. DOI:10.1186/s13046-023-02741-x.
- CHEN M W, WEI X D, SHI X, *et al.* LncRNA HIF1A-AS2 accelerates malignant phenotypes of renal carcinoma by modulating

- miR-30a-5p/SOX4 axis as a CeRNA[J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18(2): 587-603. DOI:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0209.
- [16] 王慧, 朱园园, 张岱松, 等. 二氢丹参酮I对胆囊癌细胞SGC-996凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(6): 513-517. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.06.008.
- [17] 陈卫华, 龚化, 曾皓. 彩色多普勒超声联合血清miR-128-3p和DJ-1测定对膀胱癌及其临床分期的诊断价值研究[J]. *中国医学装备*, 2023, 20(12): 82-86. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2023.12.017.
- [18] 李嘉, 杨进, 梁国标, 等. 铁死亡在前列腺癌中的研究进展[J]. *中国癌症防治杂志*, 2023, 15(03): 334-339.
- [19] ZHANG Y Y, GUO S Q, WANG S, *et al.* LncRNA OIP5-AS1 inhibits ferroptosis in prostate cancer with long-term cadmium exposure through miR-128-3p/SLC7A11 signaling[J/OL]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 220: 112376[2025-01-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34051661/>. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112376.
- [20] HAO S D, MA J X, LIU Y, *et al.* Long non-coding TUG1 accelerates prostate cancer progression through regulating miR-128-3p/YES1 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2): 619-632. DOI:10.26355/eurrev_202001_20038.
- [21] YAN M Q, CHENG S, WANG S H, *et al.* Association of genetic polymorphisms of TERT with telomere length in coke oven emissions-exposed workers[J]. *Int J Environ Health Res*, 2023, 33(11): 1059-1069. DOI:10.1080/09603123.2022.2069687.
- [22] CHEN W, HE L N, LIANG Y, *et al.* TERF1 downregulation promotes the migration and invasion of the PC3 prostate cancer cell line as a target of miR-155[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5209-5218. DOI:10.3892/mmr.2020.11623.
- [收稿日期] 2025-01-02 [修回日期] 2025-03-20
[本文编辑] 向正华