

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.11.008

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA ARHGAP5-AS1 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

胡彩霞^a, 张秀芬^a, 方凯^a, 郭子健^b, 李莉华^a (江南大学附属医院 a. 肿瘤研究所; b. 肿瘤外科, 江苏 无锡 214062)

[摘要] **目的:** 检测长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) ARHGAP5-AS1 在乳腺癌组织及细胞中的表达, 分析其表达与患者临床病理参数及预后的相关性, 并初步探讨其对乳腺癌细胞体外增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 通过对 TCGA 数据库中乳腺癌相关数据集的生物信息学分析, 筛选出在乳腺癌中低表达且与患者不良预后相关的 lncRNA ARHGAP5-AS1, 采用 qPCR 方法在江南大学附属医院肿瘤科从 2010 年 4 月至 2016 年 10 月收集的乳腺癌组织中验证其表达。采用 χ^2 检验分析 ARHGAP5-AS1 表达与乳腺癌患者临床病理参数之间的关系, Kaplan-Meier 生存分析构建生存曲线, 比较高、低表达组的总生存期和复发无复发生存期。CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验分别检测 ARHGAP5-AS1 敲低对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 BT-549 的增殖、迁移和侵袭的影响。**结果:** TCGA 数据库分析结果显示, ARHGAP5-AS1 在乳腺癌组织中的表达水平显著低于正常乳腺组织 ($P < 0.01$), 其低表达与较大肿瘤直径 (T3)、远处转移 (M1)、ER 和 PR 阴性以及较短的总生存期显著相关 (均 $P < 0.05$)。乳腺癌组织中 ARHGAP5-AS1 表达水平显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$), 其低表达与较大的肿瘤直径和淋巴结转移相关 (均 $P < 0.05$)。同样, ARHGAP5-AS1 在 6 株人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、BT-549、MDA-MB-468、MCF-7、HCC1937、Hs578T) 中的表达水平也显著低于正常乳腺上皮细胞系 (MCF-10A) (均 $P < 0.05$)。细胞功能实验显示, ARHGAP5-AS1 敲低促进 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞的增殖、迁移和侵袭 (均 $P < 0.05$)。**结论:** ARHGAP5-AS1 异常低表达可能通过促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭影响乳腺癌的发生发展。

[关键词] 乳腺癌; lncRNA ARHGAP5-AS1; TCGA 数据库; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)11-1255-09

Long non-coding RNA ARHGAP5-AS1 inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells

HU Caixia^a, ZHANG Xiufen^a, FANG Kai^a, GUO Zijian^b, LI Lihua^a (a. Oncology Institute; b. Department of Oncological Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of long non-coding RNA (lncRNA) ARHGAP5-AS1 in breast cancer (BC) tissues and cell lines, analyze its relationship with the clinicopathological parameters and prognosis of BC patients, and to investigate its effect on the proliferation, migration and invasion of BC cells *in vitro*. **Methods:** LncRNA ARHGAP5-AS1 that low expressed in BC and associated with poor prognosis was screened out by bioinformatics analysis of BC-related data sets in TCGA database. qPCR was used to verify the expression of lncRNA ARHGAP5-AS1 in BC tissues collected from April 2010 to October 2016 in the Department of Oncology, Affiliated Hospital of Jiangnan University. χ^2 test was used to analyze the relationship between the expression of ARHGAP5-AS1 and the clinicopathological parameters of BC patients. Kaplan-Meier survival analysis was performed to construct a survival curve to compare the overall and recurrence-free survival of the high and low expression groups. The effects of ARHGAP5-AS1 knockdown on the proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 and BT-549 cells were examined by CCK-8, Wound-healing assay and Transwell assay. **Results:** TCGA database analysis showed that the expression level of ARHGAP5-AS1 in BC tissues was significantly lower than that in normal breast tissues ($P < 0.01$), and its low expression was significantly related to larger tumor diameter (T3), distant metastasis (M1), negative ER and PR, and shorter overall survival (all $P < 0.05$). ARHGAP5-AS1 expression was significantly down-regulated in BC tissues compared with adjacent specimens ($P < 0.05$), which was significantly associated with larger tumor diameter and lymph node metastasis (all $P < 0.05$) in BC patients. Furthermore, ARHGAP5-AS1 was also reduced in 6 BC cell lines (MDA-MB-231, BT-549, MDA-MB-468, MCF-7, HCC1937, Hs578T) compared with normal breast epithelial cell line MCF-

[基金项目] 无锡市科技发展基金资助项目 (No.20192029)。Project supported by the Science and Technology Development Foundation of Wuxi City (No.20192029)

[作者简介] 胡彩霞 (1994-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤分子流行病学的研究, E-mail: 373026207@qq.com

[通信作者] 李莉华 (LI Lihua, corresponding author), 博士, 研究员, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤基因诊断和治疗的研究, E-mail: LLHWX-SY@aliyun.com

10A (all $P < 0.05$). Cell function experiments showed that ARHGAP5-AS1 knockdown promoted proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 and BT-549 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The abnormally low expression of ARHGAP5-AS1 may affect the occurrence and development of breast cancer by promoting the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells.

[Key words] breast cancer; lncRNA ARHGAP5-AS1; TCGA database; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(11): 1255-1263. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.008]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率呈逐年上升趋势,严重威胁着女性的身心健康^[1-3]。乳腺癌早期不具备特异性症状,临床上检出或确诊的患者以中晚期居多,治疗效果不甚理想,近年来,随着分子生物学的快速发展,人们开始探索乳腺癌的基因治疗^[4]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的大型转录本,极少具有编码蛋白质的潜力^[5]。越来越多的研究^[6-9]发现, lncRNA 在调控肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭等恶性生物学行为以及代谢、免疫反应方面起着至关重要的作用。乳腺癌细胞和组织中存在许多异常表达的 lncRNA, 它们在乳腺癌的发生、发展中发挥重要作用^[10-13]。在前期工作中,本课题组通过对美国癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库的 RNA 测序数据进行分析,发现在乳腺癌中表达下调的 lncRNA ARHGAP5-AS1, 目前其在肿瘤中尤其是在乳腺癌中的生物学功能尚不清楚。本研究旨在探讨 ARHGAP5-AS1 在乳腺癌中表达的临床意义, 以及其对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响, 为后续深入研究该 lncRNA 在乳腺癌中的作用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析

通过 TCGA 数据库检索并下载与乳腺癌相关的转录组数据(HTSeq-Counts)文件(乳腺癌组织 1 109 例, 相邻正常乳腺组织 113 例), 其中通过 SangerBox 工具箱能够获得完整临床信息的乳腺癌组织有 891 例。使用 R (版本 3.6.1) 中的 EdgeR 和 Active Perl (版本 5.28.1, 64-bit) 脚本语言用于数据整合以及乳腺癌组织与相邻正常乳腺组织之间差异 lncRNA 表达数据的提取, 以 $|\text{LogFC}| > 1.5$ 、调整后的 $P < 0.05$ 作为筛选标准。采用 Kaplan-Meier plotter 在线数据库分析 ARHGAP5-AS1 表达与乳腺癌患者无复发生存期之间的关系。

1.2 临床样本

从江南大学附属医院 2010 年 4 月至 2016 年 10 月行乳腺癌切除术的患者中, 共收集了 89 例乳腺癌组织及 62 例相应的癌旁组织(距肿瘤灶边缘 2 cm 以上)。患者年龄范围 25~78 岁, 平均年龄 (54.90±

11.32) 岁, 所有患者标本均经过病理学确诊。纳入标准: (1) 术前未进行过局部或全身治疗; (2) 病理诊断为原发性乳腺癌; (3) 存在完整的病历记录和临床随访信息。排除标准: (1) 不符合纳入标准者; (2) 入院检查发现存在除乳腺癌外的第二种癌症者。所有样本收集后立即冷冻在液氮中, 然后在 -80°C 长期保存, 用于提取 RNA。本研究获得江南大学附属医院伦理委员会的批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.3 细胞系与主要试剂

正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A 和乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT-549、MDA-MB-468、MCF-7、HCC1937、Hs578T 均购自中国科学院细胞库。

DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均自以色列 BI 公司, RNA 提取试剂、逆转录试剂和 SYBR Green 荧光定量试剂均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司, Transwell 小室购自美国康宁公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司, ARHGAP5-AS1-siRNA 干扰序列由苏州吉玛基因股份有限公司合成, 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.4 qPCR 检测 ARHGAP5-AS1 在人乳腺癌组织和细胞中的表达

用 TRIzol 试剂裂解提取组织和细胞中的总 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书操作, 将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 荧光定量试剂盒进行 qPCR 实验分析 ARHGAP5-AS1 的相对表达, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析所得数据。引物序列: GAPDH 上游为 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3', GAPDH 下游为 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'; ARHGAP5-AS1 上游为 5'-CGCTCGCCAACTACAGACATCAC-3', ARHGAP5-AS1 下游为 5'-GACTCCTCTTCTCGCTCCTGTGG-3'。

1.5 细胞培养、转染与分组

BT-549 和 HCC1937 细胞培养在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 完全培养基中; MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7 和 Hs578T 细胞培养在含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基中。所有细胞置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

取对数期生长状况良好的细胞进行转染, 按照

转染试剂Lipofectamine2000说明书的转染步骤进行操作。转染试剂和siRNA用无血清培养基稀释, 常温静置5 min。稀释好的转染试剂和siRNA按1:1比例混匀, 常温静置20 min, 将混合物加入待转染细胞中, 6~8 h后换成完全培养基继续培养24~48 h, 收取细胞沉淀进行qPCR实验检测转染效率。实验分2组: 对照组转染阴性序列(si-NC组), 敲减组转染针对ARHGAP5-AS1的siRNA(si-ARHGAP5-AS1组)。

1.6 CCK-8法检测ARHGAP5-AS1表达对乳腺癌细胞增殖的影响

按照CCK-8试剂盒的说明, 将转染后的MDA-MB-231和BT-549细胞悬浮液以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种到96孔板中, 待细胞贴壁后, 各孔中添加10 μ l的CCK-8试剂, 培养箱中继续培养2 h。分别在转染1、2、3、4和5 d后, 通过酶标仪检测在450 nm处各孔的光密度(D)值。每组设立5个复孔, 以各组 D_{450} 平均值代表细胞活力水平。

1.7 划痕实验检测敲减ARHGAP5-AS1表达对乳腺癌细胞迁移的影响

分别将MDA-MB-231和BT-549细胞接种于6孔板中, 培养至细胞达到60%~80%汇合后转染。48 h后, 使用200 μ l移液器取样头在6孔板中间刮擦单层细胞划线, 用PBS洗涤掉被刮下的细胞, 然后在无血清培养基中继续培养。在倒置显微镜下于0和24 h观察细胞的迁移并拍照, 用Image J图像分析软件测量划痕间距并计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕距离-24 h划痕距离)/0 h划痕距离 $\times 100\%$ 。

1.8 Transwell实验检测ARHGAP5-AS1表达对乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响

细胞迁移实验: 细胞转染24 h后, 更换无血清培养基饥饿培养24 h。胰酶消化细胞后收集细胞沉淀并用无血清培养基重悬细胞。将300 μ l含有 3×10^4 个细胞的细胞悬液加入小室上室, 并将小室置于24孔板中, 小室下室加入700 μ l含20%胎牛血清的DMEM或RPMI 1640培养基。12 h后取出小室, 擦去上室内侧未迁移的细胞, PBS清洗后用无水甲醇固定穿膜细胞30 min, 0.1%结晶紫染色, 清水清洗干净后倒置显微镜($\times 200$)下拍照, 随机选取5个视野计算穿膜细胞数。

细胞侵袭实验: 细胞处理步骤同细胞迁移实验, 在加入细胞悬液前先将小室用稀释好的Matrigel基质胶包被, 放入37 $^{\circ}$ C培养箱中凝固4 h备用。上室加入300 μ l含有 8×10^4 个细胞的细胞悬液, 24 h后取出小室。其余步骤同细胞迁移实验。

1.9 统计学处理

使用SPSS 23.0统计软件和GraphPad Prism 7.0进行数据分析和作图。本研究的所有实验独立重复

3次, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的差异比较采用独立样本 t 检验, 计数资料分析采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

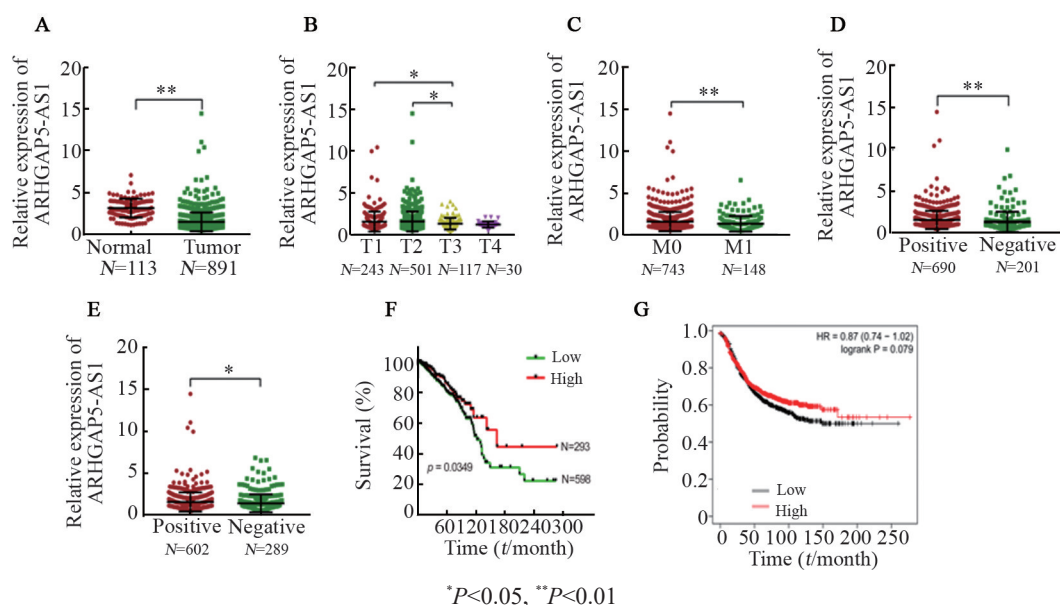
2.1 ARHGAP5-AS1在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征和预后的关系

通过分析TCGA数据库中乳腺癌的全基因组表达谱数据发现, ARHGAP5-AS1在TCGA人乳腺癌组织中的表达显著低于正常组织($t=14.730, P < 0.01$, 图1A), 初步筛选出在乳腺癌中异常表达的ARHGAP5-AS1。

对TCGA数据库中乳腺癌患者ARHGAP5-AS1的临床特征(具体见表1)进行分析发现, 与较小肿瘤直径的T1($t=2.098, P=0.0366$)和T2($t=2.306, P=0.0214$)相比, 肿瘤直径为T3的乳腺癌组织中ARHGAP5-AS1表达水平更低(图1B)。另外, ARHGAP5-AS1低表达与远处转移(M1)相关($t=2.589, P=0.0098$, 图1C)。ARHGAP5-AS1在ER阴性和PR阴性乳腺癌组织中的表达分别低于ER阳性($t=2.663, P=0.0079$; 图1D)和PR阳性($t=2.011, P=0.0446$; 图1E)组织。Kaplan-Meier曲线分析显示, ARHGAP5-AS1低表达预示着较短的总生存期($P=0.0349$, 图1F)。Kaplan-Meier plotter在线数据库分析表明, ARHGAP5-AS1低表达患者呈现出无复发生存期较短的趋势, 但差异无统计学意义($P=0.079$, 图1G)。

采用qPCR法检测在本院收集的89例人乳腺癌组织和62例癌旁组织中ARHGAP5-AS1的表达水平, 结果显示, 乳腺癌组织中ARHGAP5-AS1的表达显著低于癌旁组织($t=2.639, P=0.0092$, 图2A)。同样, 在6株人乳腺癌细胞系MDA-MB-231、BT-549、MDA-MB-468、HCC1937、MCF-7和Hs578T中ARHGAP5-AS1的表达水平显著低于正常人乳腺上皮细胞系MCF-10A(均 $P < 0.05$, 图2B)。以上结果与TCGA数据库分析结果一致。

随后, 本研究探讨ARHGAP5-AS1表达在本研究收集的乳腺癌患者中的临床价值, 以ARHGAP5-AS1表达水平的平均值($\bar{x}=0.148$)为界值, 将患者分为ARHGAP5-AS1高表达组(29例)和低表达组(60例)。结果如表2所示, ARHGAP5-AS1低表达与较大肿瘤直径($P=0.0280$)及淋巴结转移($P=0.0230$)显著相关。然而, ARHGAP5-AS1与其他临床病理特征如年龄、TNM分期、分级、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)以及人表皮生长因子受体2(HER2)等无显著相关性(均 $P > 0.05$)。此外, ARHGAP5-AS1低表达患者呈现出总体生存期($P=0.2031$, 图2C)和无复发生存期($P=0.1377$, 图2D)较短的趋势, 但差异无统计学意义。



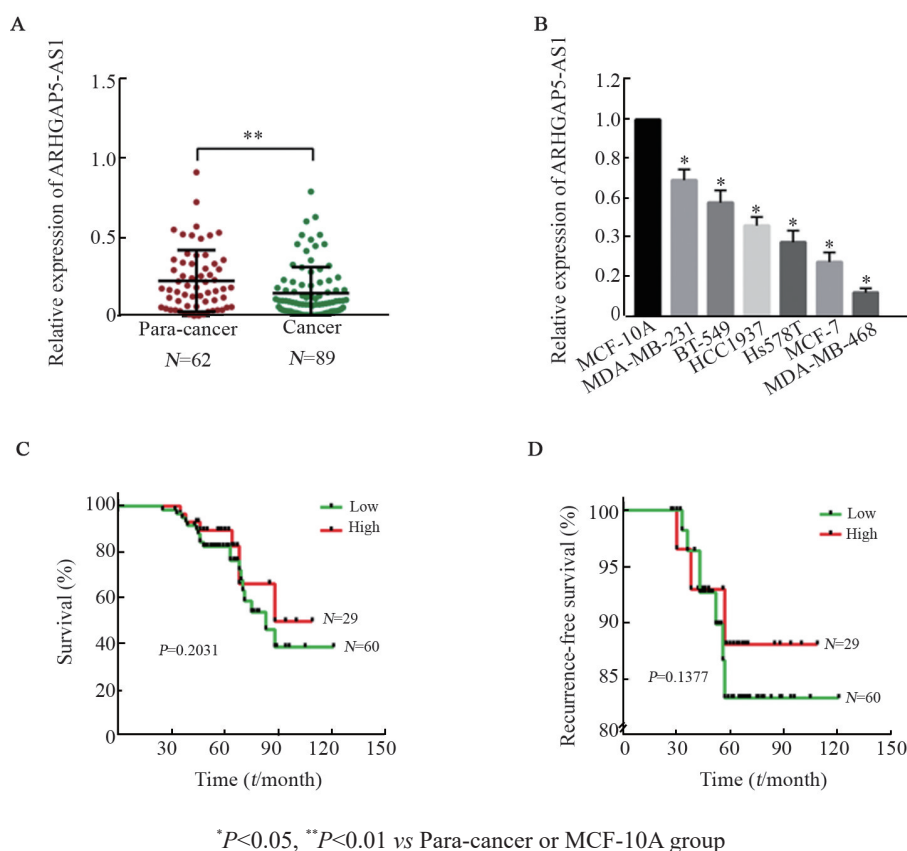
A: Relative expression of ARHGAP5-AS1 in breast cancer tissue and normal tissue; B-E: Relative expression of ARHGAP5-AS1 in different T classifications, M classifications, ER status and PR status in TCGA; F: Overall survival curve of BC patients with high or low expression of ARHGAP5-AS1; G: Online construction of recurrence-free survival curve by Kaplan-Meier plotter

图1 ARHGAP5-AS1在乳腺癌组织中低表达并预示较差的临床特征(数据来自TCGA数据库)

Fig.1 ARHGAP5-AS1 was downregulated in BC tissues and predicted a poor prognosis (data came from TCGA database)

表1 TCGA数据库中乳腺癌患者ARHGAP5-AS1的表达与临床病理特征之间的关系[n(%)]
Tab.1 Relationship between ARHGAP5-AS1 expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients in TCGA database [n(%)]

Characteristics	N	ARHGAP5-AS1 expression		χ^2	P
		Low	High		
All	891	598	293		
Age(t/a)				2.310	0.129
≤50	286	182 (30.4)	104 (35.5)		
>50	605	416 (69.6)	189 (64.5)		
Grading				1.234	0.745
I	160	113 (18.9)	47 (16.0)		
II	504	336 (56.2)	168 (57.4)		
III	202	132 (22.1)	70 (23.9)		
IV	25	17 (2.8)	8 (2.7)		
T classification				10.105	0.018
T1	243	158 (26.4)	85 (27.3)		
T2	501	326 (54.5)	175 (56.2)		
T3	117	88 (14.7)	29 (13.1)		
T4	30	26 (4.4)	4 (3.4)		
N classification				2.24	0.134
N0	476	309 (51.7)	167 (57.0)		
N1-N3	415	289 (48.3)	126 (43.0)		
M classification				4.999	0.025
M0	743	487 (81.4)	256 (83.4)		
M1	148	111 (18.6)	37 (16.6)		
ER				28.150	0.000
Positive	690	432 (72.2)	258 (88.1)		
Negative	201	166 (27.8)	35 (11.9)		
PR				6.734	0.009
Positive	602	387 (64.7)	215 (73.4)		
Negative	289	211 (35.3)	78 (26.6)		
HER2				0.748	0.387
Positive	362	237 (39.6)	125 (42.7)		
Negative	529	361 (60.4)	168 (57.3)		



A: Relative expression of ARHGAP5-AS1 in breast cancer tissue and para-cancer tissue; B: Relative expression of ARHGAP5-AS1 in normal breast epithelial cell lines and different breast cancer cell lines; C: Overall survival curve; D: Recurrence-free survival curve

图2 ARHGAP5-AS1在乳腺癌组织和细胞中呈低表达并预示较差的临床特征

Fig.2 ARHGAP5-AS1 was downregulated in breast tissues and cell lines and predicted a poor prognosis

2.2 敲减 ARHGAP5-AS1 表达促进乳腺癌细胞的增殖

为了评估 ARHGAP5-AS1 对乳腺癌细胞增殖的生物学作用,采用 si-RNA 敲减 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞中 ARHGAP5-AS1 的表达。qPCR 检测结果(图 3A)显示,与 si-NC 组相比,si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 ($t=64.090, P<0.01$) 和 BT-549 细胞 ($t=23.800, P<0.01$) ARHGAP5-AS1 的表达水平显著下降,干扰效率约 65%。CCK-8 实验结果(图 3B)表明,从第 3 天起,si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞的增殖活力明显高于 si-NC 组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 敲减 ARHGAP5-AS1 表达促进乳腺癌细胞的迁移

划痕实验结果显示,si-NC 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞的划痕愈合率分别为 (45.16±6.25)%, (59.78±4.56)%; si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞的划痕愈合率分别为 (87.87±2.39)%, (96.83±1.46)%。与 si-NC 组相比,si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 细胞 ($t=6.391, P=0.0031$) 和 BT-549 细胞 ($t=7.743, P=0.0015$) 的划痕愈合率明显升高(图 4)。Transwell 细胞迁移实验结果(图 5)显示,si-NC 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞迁移数量分别

为 (54.33±5.90) 和 (153.70±10.74) 个; si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞迁移数量分别为 (106.00±4.58) 和 (300.30±17.02) 个; 同样地,与 si-NC 组相比,si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 细胞 ($t=6.918, P=0.0023$) 和 BT-549 细胞 ($t=7.286, P=0.0019$) 迁移数量明显增多。

2.4 敲减 ARHGAP5-AS1 促进乳腺癌细胞的侵袭

Transwell 侵袭实验结果(图 6)显示,si-NC 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞侵袭数量分别为 (132.70±10.53) 和 (48.00±6.66) 个; si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 和 BT-549 细胞侵袭数量分别为 (215.70±12.14) 和 (101.70±8.11) 个。与 si-NC 组相比,si-ARHGAP5-AS1 组 MDA-MB-231 细胞 ($t=5.165, P=0.0067$) 和 BT-549 细胞 ($t=5.114, P=0.0069$) 侵袭至小室下侧的细胞数量明显增多。

3 讨论

中国女性最常见的癌症是乳腺癌,占女性癌症总病例的 19.2%,其病死数占中国癌症死亡总数的 9.1%,成为中国女性健康的主要疾病负担^[14-15]。尽管近 20 年来,乳腺癌的早期诊断和治疗方面取得了较

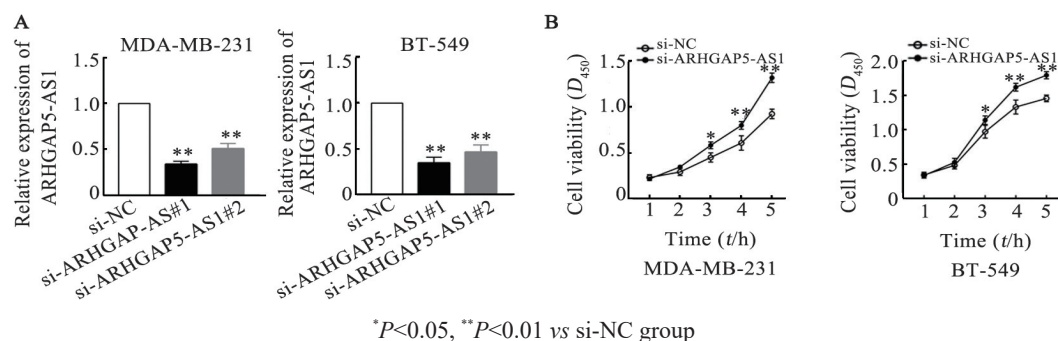
大的进展,但乳腺癌仍然是一个重大的公共卫生问题。在早期的肿瘤研究中,人们对于乳腺癌的研究局限在蛋白编码基因。而在人类基因组中,约98%为非蛋白编码序列,其转录产物组成了庞大复杂的非编码RNA,近年来多项研究^[16-19]证实, lncRNA在包括乳腺癌在内的多种癌症中异常表达及功能障碍,参与肿瘤的发生和进展。例如, lncRNA LOXL1-AS1在乳腺癌组织和细胞中表达上调并与肿瘤分期和淋巴结转移相关,细胞实验和动物实验均表明 LOXL1-

AS1在乳腺癌发挥促癌基因的作用^[20]。本课题组前期研究显示 lncRNA ST8SIA6-AS1以p38丝裂原活化蛋白激酶信号介导的方式促进乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移^[21]。ZHU等^[22]研究发现, ARHGAP5-AS1在化疗耐药的胃癌细胞中上调,将其敲减可逆转化疗耐药,而 ARHGAP5-AS1自噬降解受损则促进了化疗耐药。然而,关于 lncRNA ARHGAP5-AS1在乳腺癌中的表达和作用仍少见报道。

表2 ARHGAP5-AS1的表达与乳腺癌患者临床病理特征之间的关系[n(%)]

Tab.2 The relationship between the expression of ARHGAP5-AS1 and clinicopathological characteristics in breast cancer patients [n(%)]

Characteristics	N	ARHGAP5-AS1 expression		χ^2	P
		Low	High		
All	89	60	29		
Age(t/a)				0.343	0.558
≤50	30	19 (31.7)	11 (37.9)		
>50	59	41 (68.3)	18 (62.1)		
TNM stage				0.002	0.962
I - II	58	39 (65.0)	19 (65.5)		
III	31	21 (35.0)	10 (34.5)		
Grading				4.438	0.108
I	11	7 (11.7)	4 (13.8)		
II	43	25 (41.7)	18 (62.1)		
III	35	28 (46.6)	7 (24.1)		
Tumor size (d/cm)				4.822	0.028
≤2.0	29	15 (25.0)	14 (48.3)		
>2.0	60	45 (75.0)	15 (51.7)		
Lymph node metastasis				5.147	0.023
Positive (present)	52	40 (66.7)	12 (41.4)		
Negative (absent)	37	20 (33.3)	17 (58.6)		
ER				0.936	0.333
Positive	55	35 (58.3)	20 (69.0)		
Negative	34	25 (41.7)	9 (31.0)		
PR				2.279	0.131
Positive	44	33 (55.0)	11 (37.9)		
Negative	45	27 (45.0)	18 (62.1)		
HER2				0.215	0.643
Positive	73	50 (83.3)	23 (79.3)		
Negative	16	10 (16.7)	6 (20.7)		



A: qPCR was performed to test the expression of ARHGAP5-AS1; B: The proliferation ability of cells was detected by CCK-8

图3 敲低 ARHGAP5-AS1对乳腺癌细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of ARHGAP5-AS1 knockdown on proliferation of breast cancer cells

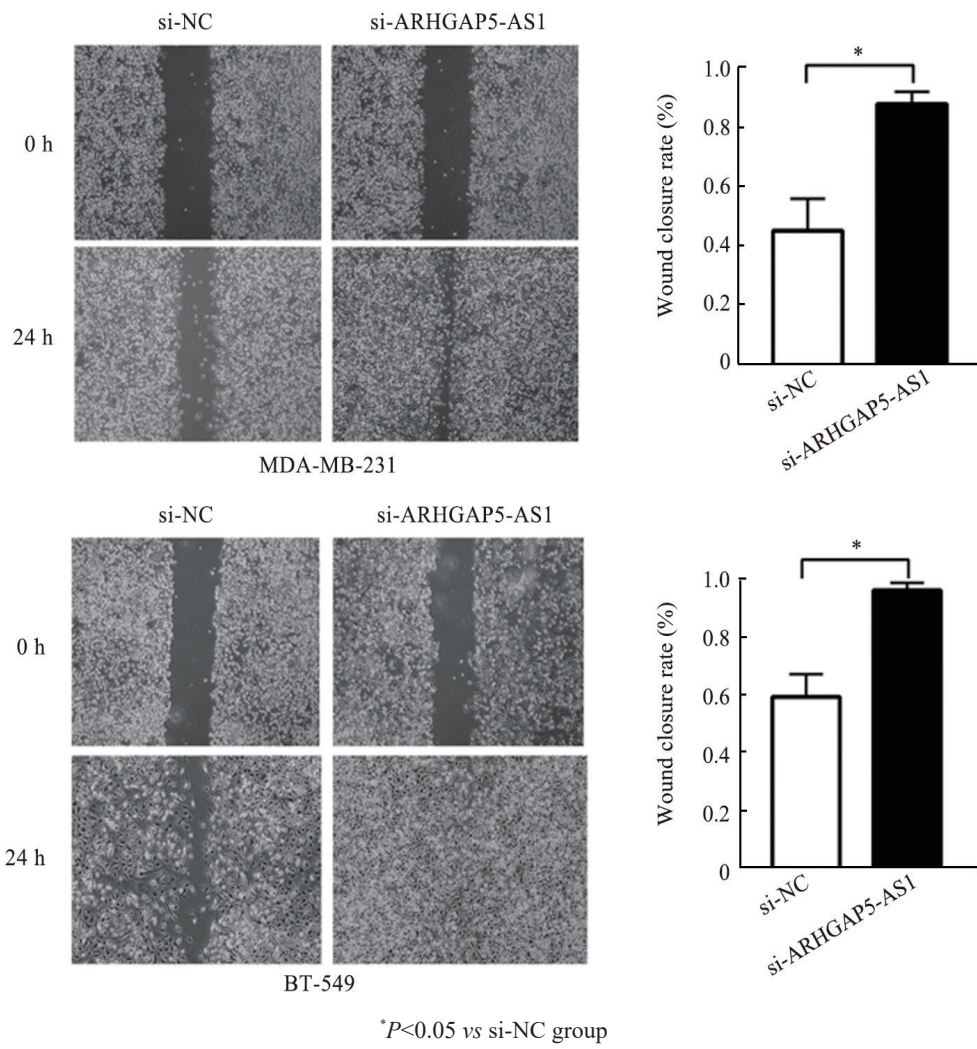


图4 敲低 ARHGAP5-AS1 对乳腺癌细胞迁移的影响(×40)

Fig.4 The Effect of ARHGAP5-AS1 knockdown on migration of breast cancer cells (×40)

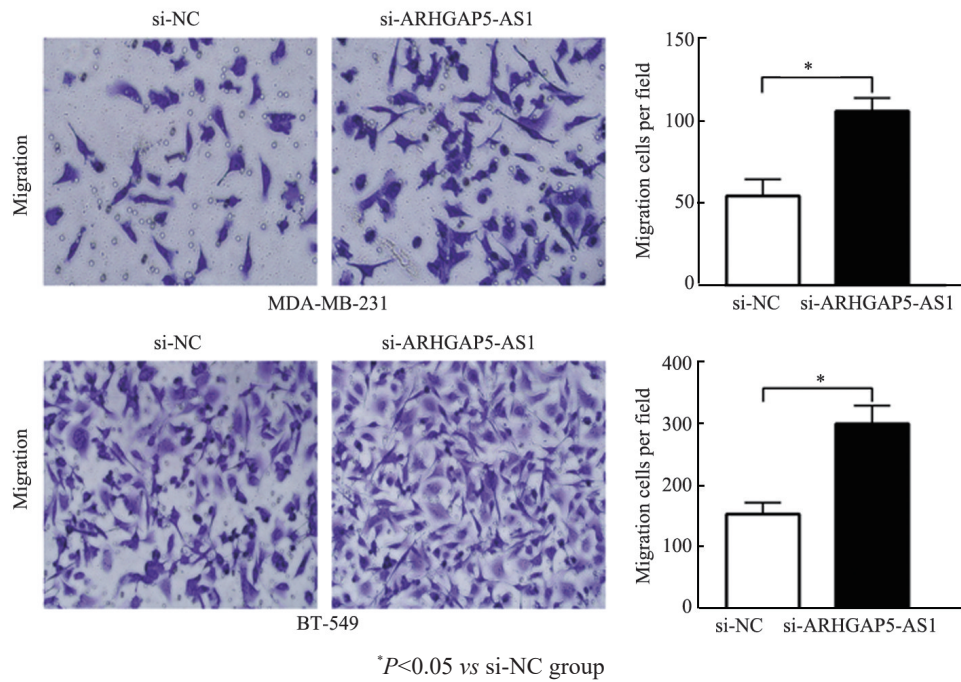


图5 敲低 ARHGAP5-AS1 对乳腺癌细胞迁移的影响(结晶紫染色, ×200)

Fig.5 The Effect of ARHGAP5-AS1 knockdown on migration of breast cancer cells (crystal violet staining, ×200)

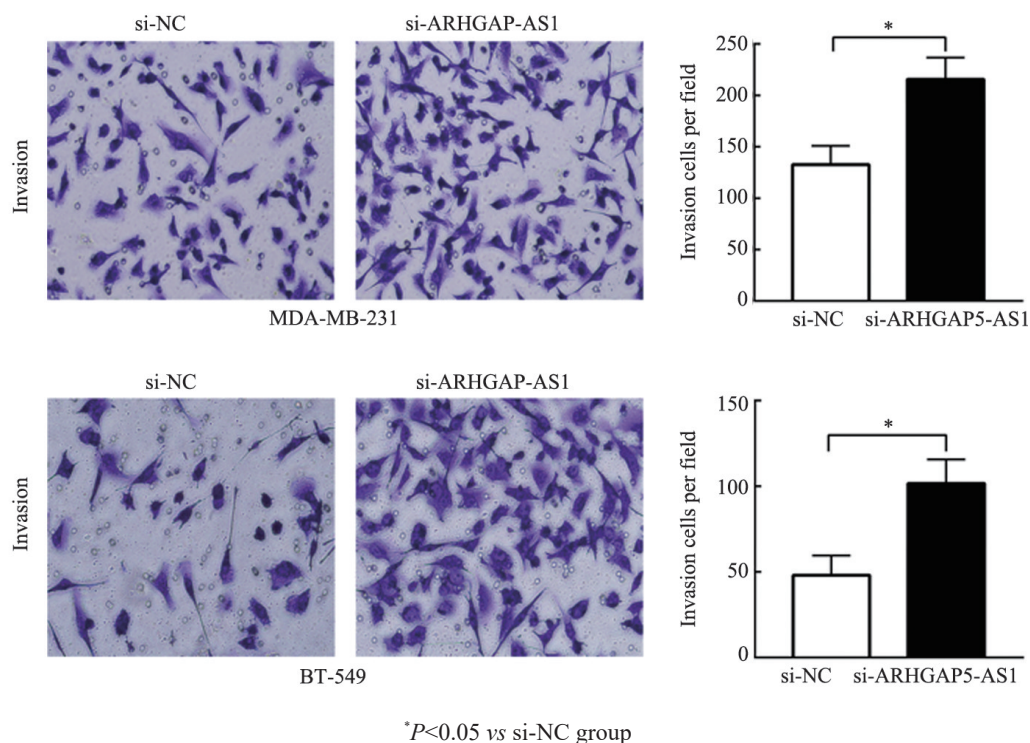


图6 敲低 ARHGAP5-AS1 对乳腺癌细胞侵袭的影响(结晶紫染色, ×200)

Fig.6 The Effect of ARHGAP5-AS1 knockdown on invasion of breast cancer cells (crystal violet staining, ×200)

本课题组前期通过对 TCGA 数据库下载的乳腺癌数据集进行生物信息学分析,发现 lncRNA ARHGAP5-AS1 在乳腺癌组织中低表达,且低表达患者总体生存期较短。后续临床病理特征分析发现, ARHGAP5-AS1 低表达相关于较大肿瘤,远处转移,以及 ER、PR 阴性。进一步采用本单位收集的人乳腺癌组织及细胞系进行验证,与 TCGA 预测一致, ARHGAP5-AS1 在乳腺癌组织中低表达,且低表达患者呈现出总体生存期和无复发生存期较短的趋势,但可能由于样本量有限,随访时间不够长,导致差异无统计学意义。ARHGAP5-AS1 低表达相关于较大的肿瘤及淋巴结转移。乳腺癌异常的增殖和转移能力是影响患者预后的重要因素,本研究通过体外细胞实验探讨 ARHGAP5-AS1 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 BT-549 增殖、迁移和侵袭的作用,结果发现,敲减 ARHGAP5-AS1 的表达后乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭显著增强,在细胞学上证明 ARHGAP5-AS1 与乳腺癌转移的生物学行为有密切关系。但 ARHGAP5-AS1 是通过何种具体的分子机制来发挥抑癌作用尚待阐明。

作为一种竞争性内源性 RNA, lncRNA 可以与微小 RNA (microRNA, miRNA) 互作结合来发挥具体的功能。已有研究^[23-28]表明 miR-212-5p、miR-765、miR-423-5p 在多种肿瘤中发挥致癌作用。miR-212-5p 可以通过靶向 Id3 并在体内激活 PI3K/Akt 途径来促进肿瘤发生^[23]。miR-765 在食管鳞状细胞癌中表达上

调且与患者的总生存期和无复发生存显著相关^[24]。miR-423-5p 通过下调 PROX1 介导乳腺癌细胞功能和肿瘤生长^[28]。本研究通过生物信息学分析和序列比对发现, ARHGAP5-AS1 可能与 miR-212-5p、miR-765、miR-423-5p 等促癌 miRNA 的 3' 端 UTR 互补结合,预示 ARHGAP5-AS1 可能作为它(们)的分子海绵,促进其靶分子的表达,活化其下游信号通路,进而抑制乳腺癌生长、转移。因此探讨与 ARHGAP5-AS1 互作的关键 miRNA 可能是下一步的研究重点。

综上所述,本研究利用 TCGA 数据库分析结合临床组织标本验证发现 ARHGAP5-AS1 在乳腺癌组织中低表达,且与患者恶性临床病理特征及不良预后相关。沉默 ARHGAP5-AS1 表达会增强乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。本研究的发现有助于加深理解 ARHGAP5-AS1 在乳腺癌中的抑癌作用,为探寻乳腺癌的潜在预后预测标志物及可能的治疗靶点提供了理论依据,并为后续的机制研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5):363-385. DOI:10.3322/caac.21565.
 [2] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(6): 438-451. DOI: 10.3322/caac.21583.
 [3] 景文江, 郭翠萍, 马军, 等. miR-144 和 lncRNA DNAJC3-AS1 在乳腺癌组织中的表达及其在乳腺癌细胞 MCF-7 化疗耐药中的作用

- [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(2): 177-183. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.012.
- [4] CHRISTIAN N, GEMIGNANI M L. Issues with fertility in young women with breast cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21(7): 58. DOI:10.1007/s11912-019-0812-4.
- [5] LEE J T. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs[J]. *Science*, 2012, 338(6113): 1435-1439. DOI:10.1126/science.1231776.
- [6] KONDO Y, SHINJO K, KATSUSHIMA K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers[J/OL]. *Cancer Sci*, 2017, 108(10): 1927-1933[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5623749/>. DOI:10.1111/cas.13342.
- [7] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006.
- [8] CHEN Y C, XIE H B, ZOU Y F, et al. Tetracycline-controllable artificial microRNA-HOTAIR+EZH2 suppressed the progression of bladder cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(8): 1597-1607. DOI: 10.1039/c7mb00202e.
- [9] 李纲, 王妹兴, 杨梅, 等. Tspan29 在乳腺癌组织中的表达及其对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(1): 42-49. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.007.
- [10] QIU X, DONG J, ZHAO Z, et al. LncRNA LINC00668 promotes the progression of breast cancer by inhibiting apoptosis and accelerating cell cycle[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 5615-5625[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628964/>. DOI: 10.2147/ott.s188933.
- [11] FU J, DONG G, SHI H, et al. LncRNA MIR503HG inhibits cell migration and invasion via miR-103/OLFM4 axis in triple negative breast cancer[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7):4738- 4745[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6584514/>. DOI:10.1111/jcmm.14344.
- [12] HUA K Y, DENG X C, HU J S, et al. Long noncoding RNA HOST2, working as a competitive endogenous RNA, promotes STAT3-mediated cell proliferation and migration via decoying of let-7b in triple-negative breast cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 58. DOI:10.1186/s13046-020-01561-7.
- [13] 吴多明, 武力, 张晓斌. 长链非编码RNA BDNF-AS 在乳腺癌中的表达及作用[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(14): 712-717. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2019.14.931.
- [14] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J/OL]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6487510/>. DOI: 10.1186/s40880-019-0368-6.
- [15] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.008.
- [16] DONG H, HU J, ZOU K, et al. Activation of lncRNA TINCR by H3K27 acetylation promotes trastuzumab resistance and epithelial-mesenchymal transition by targeting MicroRNA-125b in breast Cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 3[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323810/>. DOI: 10.1186/s12943-018-0931-9.
- [17] THIN K Z, LIU X F, FENG X B, et al. LncRNA-DANCR: a valuable cancer related long non-coding RNA for human cancers[J]. *Pathol-Res Pract*, 2018, 214(6): 801-805. DOI:10.1016/j.prp.2018.04.003.
- [18] PANOUTSOPOULOU K, AVGERIS M, SCORILAS A. miRNA and long non-coding RNA: molecular function and clinical value in breast and ovarian cancers[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(11): 963-979. DOI:10.1080/14737159.2018.1538794.
- [19] ZHAO X D, LIU Y B, YU S. Long noncoding RNA AWPPH promotes hepatocellular carcinoma progression through YBX1 and serves as a prognostic biomarker[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(7): 1805-1816. DOI:10.1016/j.bbadis.2017.04.014.
- [20] DONG H T, LIU Q, ZHAO T, et al. Long non-coding RNA LOXL1-AS1 drives breast cancer invasion and metastasis by antagonizing miR-708-5p expression and activity[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19:696-705[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6965509/>. DOI:10.1016/j.omtn.2019.12.016.
- [21] FANG K, HU C, ZHANG X, et al. LncRNA ST8SIA6-AS1 promotes proliferation, migration and invasion in breast cancer through the p38 MAPK signalling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(9): 1273-1281. DOI:10.1093/carcin/bgz197.
- [22] ZHU L, ZHU Y, HAN S, et al. Impaired autophagic degradation of lncRNA ARHGAP5-AS1 promotes chemoresistance in gastric cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6):383[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6522595/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1585-2.
- [23] CHEN F F, SUN N, WANG Y, et al. miR-212-5p exerts tumor promoter function by regulating the Id3/PI3K/Akt axis in lung adenocarcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 7273-7282. DOI:10.1002/jcp.29627.
- [24] JIANG B, XU G, LV H Q, et al. Up-regulation of miR-765 predicts a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3789-3794. DOI:10.26355/eurrev_201806_15261.
- [25] DU W, FENG Z, SUN Q. LncRNA LINC00319 accelerates ovarian cancer progression through miR-423-5p/NAC1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1/2/3/4): 198-202. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.11.006.
- [26] LI S, ZENG A, HU Q, et al. miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(1): 55-65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5193021/>. DOI:10.1093/neuonc/now129.
- [27] LIN H L, LIN T Q, LIN J G, et al. Inhibition of miR-423-5p suppressed prostate cancer through targeting GRIM-19[J]. *Gene*, 2019, 688: 93-97. DOI:10.1016/j.gene.2018.11.021.
- [28] SUN X, HUANG T, ZHANG C, et al. Long non-coding RNA LINC00968 reduces cell proliferation and migration and angiogenesis in breast cancer through up-regulation of PROX1 by reducing hsa-miR-423-5p[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(16): 1908-1924. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681781/>. DOI: 10.1080/15384101.2019.1632641.

[收稿日期] 2020-04-15

[修回日期] 2020-09-19

[本文编辑] 黄静怡