

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.11.016

· 短篇论著 ·

lncRNA LINC00504 在乳腺癌组织及细胞中的表达、功能及可能机制

Expression, function and possible mechanism of lncRNA LINC00504 in breast cancer tissues and cells

何健¹, 欧阳倩雯² (1. 宜春市人民医院 肿瘤科, 江西 宜春 336099; 2. 南昌市第三医院 乳腺外科, 江西 南昌 330008)

[摘要] **目的:**探讨 lncRNA LINC00504 在乳腺癌中的表达、功能及可能的机制。**方法:**利用 GEPIA 等多个数据库分析 LINC00504 在乳腺癌组织中的表达及其与患者预后关系、与乳腺癌驱动基因相关性, 筛选与 LINC00504 表达密切相关的关键基因并分析其相关信号通路。将 si-LINC00504 转染三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 SKBR3, qPCR 检测转染细胞中 LINC00504 的表达; CCK-8 法检测转染细胞的增殖能力。**结果:**数据库分析显示 LINC00504 在乳腺癌组织和体外培养 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞中均呈高表达, 其高表达患者的 PFS 长于低表达患者。LINC00504 表达与乳腺癌驱动基因 ERBB2 和 BRCA1 呈正相关、与 BRCA2 呈负相关, LINC00504 相关的 20 个关键基因涉及多种肿瘤, 主要参与氨基酸代谢、糖酵解/糖异生途径。敲减 LINC00504 表达可促进 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞的增殖。**结论:**在乳腺癌组织中高表达的 LINC00504 与患者 PFS 有关联; 其相关基因可能参与多种肿瘤的氨基酸和糖代谢; 敲减 LINC00504 可促进 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞的增殖。

[关键词] 乳腺癌; 长链非编码 RNA; LINC00504; 增殖; 代谢

[中图分类号] R737.9; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)11-1045-04

乳腺癌是女性中致死人数最多的恶性肿瘤^[1], 遗传变异和表观遗传调控是乳腺癌可能的发病机制。研究^[2]表明 ERBB2、BRCA1/2 等是乳腺癌中突变频率最高的基因, 靶向这些基因的药物大大改善了乳腺癌患者预后。研究^[3]证实长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 不仅可作为乳腺癌诊疗标志物, 还可参与乳腺癌发生发展过程^[4]。lncRNA 通海绵样吸附或其他途径在乳腺癌的发生发展中起着促癌或抑癌样作用^[5-9], 还在乳腺癌药品治疗抵抗方面起着不容忽视的作用^[10-11]。

lncRNA LINC00504 被证实多种肿瘤中起促癌作用^[12]。MATHIAS 等^[13]通过数据库数据分析发现, LINC00504 在 luminal A 型乳腺癌中表达增加, 且与患者预后呈正相关, 敲减其表达会抑制乳腺癌细胞增殖。YU 等^[14]证实 LINC00504 通过降解 miR-876-3p 上调 HMGB3 而起促癌作用。本研究拟通过数据库数据分析 LINC00504 在乳腺癌组织中的表达, 并通过敲减其表达检测乳腺癌细胞增殖的变化, 同步分析与乳腺癌中与 LINC00504 最紧密有关的基因及其相关信号通路, 为寻找乳腺癌治疗的潜在靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 利用数据库分析 LINC00504 表达与患者预后关系及其相关关键基因和信号通路

利用在线数据库 GEPIA ([http://gepia.cancer-pku.](http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php)

[cn/detail.php](http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php)) 和 TCGA 数据库分析 LINC00504 在乳腺癌组织及正常乳腺组织中表达差异情况, 利用 Kaplan-Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com/analysis>) 分析 LINC00504 表达与预后关系。利用软件 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 和 Kobas3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3>) 分析 LINC00504 相关的 20 个关键基因及其有关信号通路。

1.2 实验材料

三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231、SKBR3 及正常乳腺上皮细胞 MCF10A 均购自上海生命科学研究院细胞中心。高糖 DMEM、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、马血清、TRIzol、Lipofectamine 2000、胰酶均购自美国 Thermo Fisher 公司, CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物公司, PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR 定量 PCR 试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ II 均购自宝日医生物(北京)公司。引物和 si-LINC00504 等均由广州英潍捷基公司合成。

1.3 细胞转染 si-LINC00504 以敲低 LINC00504 的表达

将 MDA-MB-231 细胞接种于含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, SKBR3 细胞接种于含有 20% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, MCF10A 细胞接种于

[基金项目] 江西省卫生计生委科技计划项目 (No. 20197039)

[作者简介] 何健 (1977—), 男, 硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事乳腺癌转移的分子机制研究, E-mail: 78983151@qq.com

[通信作者] 欧阳倩雯, E-mail: oyqw780503@163.com

含有马血清、EGF、胰岛素、氢化可的松的DMEM/F12培养基中。所有细胞常规条件下培养和消化传代。转染前24 h,取对数生长期细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,按照Lipofectamine2000说明书,在si-LINC00504组细胞中分别加入相应的3条si-LINC00504, siRNA1为5'-UAAUCAUUUCUUCU UUUGGU-3', siRNA2为5'-UGAUUUUAGUUAUUU CUUGCC-3', siRNA3为5'-AUUAAUAUGACAUCU AGUGGC-3',对照组细胞中转染的si-NC为5'-UUU UUAUUGAGUCUAUUUGAU-3',按说明书操作转染,48 h后用qPCR法检测细胞中LINC00504表达水平。

采用TRIzol法提取各组细胞总RNA,逆转录成cDNA。用SYBR定量PCR试剂盒进行qPCR检测,LINC00504引物F为5'-TGGGTGAAGTGAAGTGG GTG-3',R为5'-GCAGCCTCCAGGGTGAATCA-3'; GAPDH引物F为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',R为5'-GAAGATGGTGTATGGGATTC-3'。设3个复孔,重复3次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因表达水平。

1.4 CCK-8法检测转染后细胞的增殖水平

转染24 h后细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,实验分si-NC组和si-LINC00504组,每组设6个复孔。在细胞培养24、48、72 h时,在各时点取2复孔的培养板,以CCK-8法检测细胞增殖情况。

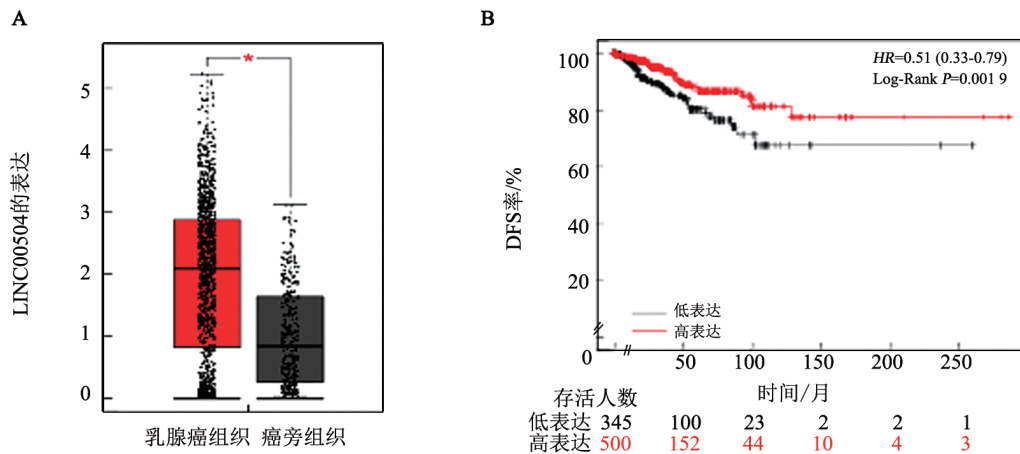
1.5 统计学处理

采用SPSS 21.0软件。符合正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用t检验;计数资料以百分率表示,比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中LINC00504呈高表达且高表达患者PFS长

数据库数据分析显示,与癌旁组织比较,LINC00504在乳腺癌组织中呈明显高表达($P < 0.001$,图1A);但在各分级组织之间并无明显差异。还显示,LINC00504高表达与低表达患者的OS无差异,但高表达DFS比低表达患者的长($P < 0.01$,图1B)。



* $P < 0.001$
图1 数据库分析乳腺癌组织中LINC00504表达(A)及其与患者预后(B)的关系

2.2 LINC00504表达与乳腺癌驱动基因ERBB2、BRCA1和BRCA2表达相关

数据库数据分析表明,乳腺癌组织中LINC00504与ERBB、BRCA1表达呈正相关($P < 0.001$,图2A、B),与BRCA2表达呈负相关(图2C, $P < 0.001$),与PIK3CA和NTRK1表达无相关性。

2.3 LINC00504可能参与多种肿瘤及其代谢相关的信号通路

数据库数据分析显示,与LINC00504表达最紧密相关的前20个基因见表1,这些基因参与多种氨基酸代谢途径、糖酵解/糖异生途径及胰岛素分泌、脂肪消化与吸收等多个信号通路。

2.4 LINC00504在MDA-MB-231、SKBR3细胞中呈高表达且敲减表达能促进细胞增殖活力

qPCR法检测显示,与MCF10A细胞相比,MDA-MB-231和SKBR3细胞中LINC00504呈高表达(均 $P < 0.01$),与si-NC组细胞比较,si-LINC00504组细胞中LINC00504的表达明显降低(均 $P < 0.01$,图3B)。CCK-8法检测结果显示,敲减LINC00504后细胞增殖水平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图3C、D)。

3 讨论

目前,有关LINC00504在肿瘤中表达和功能的研究很少。FENG等^[15]发现,LINC00504在结肠癌细

胞和组织中呈高表达, 体外条件下促进细胞侵袭和迁移; 有研究^[12]显示, 敲减肺癌细胞中 LINC00504 表达可通过上调 miR-876-3p 而抑制细胞增殖和迁移; LIU 等^[6]证实 LINC00504 在卵巢癌组织和细胞中呈高表达, 敲减其表达可抑制细胞增殖并促进其凋亡, 其机制可能与上调 miR-1244 表达有关。新近, MATHIAS 等^[13]分析发现 LINC00504 在 luminal A 型乳腺癌中表达增加, 并与基底样型乳腺癌患者预后呈正相关, 敲减 LINC00504 在 luminal A 型乳腺癌细胞中的表达可抑制其增殖和克隆形成。本文通过多个数据库数据分析 1 085 例乳腺癌组织中 LINC00504 呈高表达, 其在三阴乳腺癌 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞中也呈高表达, 且高表达患者 DFS 明显长于低表达患者。通过生物信息学分析筛选出乳腺癌组织中与 LINC00504 表达密切相关的 20 个关键基因, 它们相关的信号通路涵盖多种肿瘤和多种氨基酸代谢途径、糖酵解/糖异生途径、胰岛素分泌、脂肪消化与吸收等途径, 提示 LINC00504 可能通过调控氨基酸代谢和糖酵解/糖异生促进乳腺癌细胞的增殖。

表 1 GEPIA 数据库数据筛选乳腺癌组织中与 LINC00504 表达密切相关的基因

基因名称	编号	r
CPEB2	ENSG00000137449.15	0.71
TADA2B	ENSG00000173011.11	0.61
GATA3	ENSG00000107485.15	0.61
TBC1D9	ENSG00000109436.7	0.6
FBXL5	ENSG00000118564.14	0.6
ZNF396	ENSG00000186496.10	0.59
PIGV	ENSG00000060642.10	0.58
CPEB2-AS1	ENSG00000247624.6	0.58
FOXA1	ENSG00000129514.5	0.57
RASEF	ENSG00000165105.9	0.56
RP11-10K16.1	ENSG00000245213.6	0.56
C10orf32	ENSG00000166275.15	0.56
NUDT12	ENSG00000112874.9	0.56
TAPT1	ENSG00000169762.16	0.55
ZBTB4	ENSG00000174282.11	0.55
TTC8	ENSG00000165533.18	0.55
XBP1	ENSG00000100219.16	0.55
MED13L	ENSG00000123066.7	0.55
KIAA1109	ENSG00000138688.15	0.55
LRBA	ENSG00000198589.10	0.55

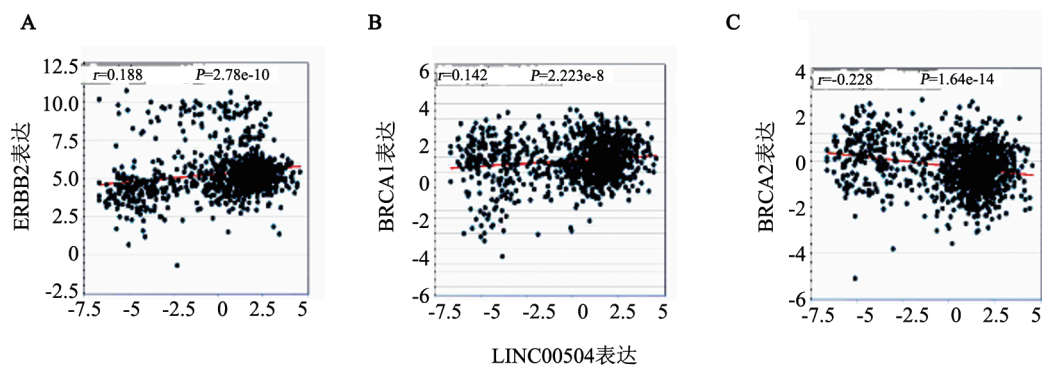


图 2 LINC00504 与乳腺癌驱动基因 ERBB2(A)、BRCA1(B) 和 BRCA2(C) 表达相关

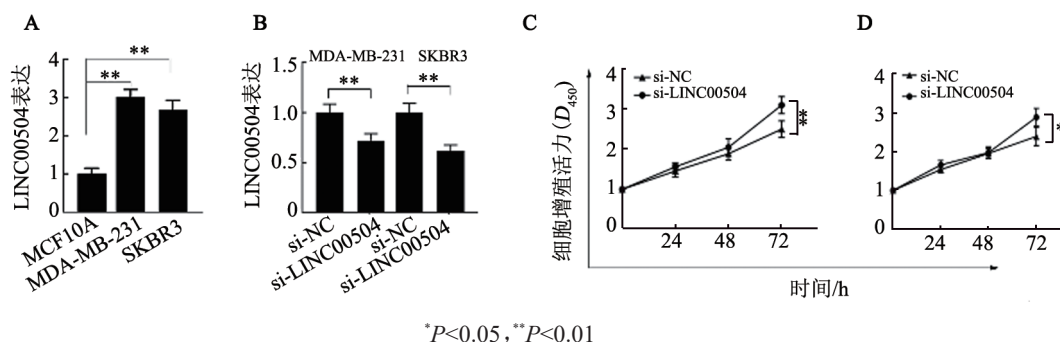


图 3 LINC00504 在乳腺癌细胞中表达(A)及敲减 LINC00504(B)后促进 MDA-MB-231、SKBR3 细胞的增殖(C、D)

本研究还发现 LINC00504 与乳腺癌驱动基因 ERBB2 和 BRCA1 呈正相关, 与 BRCA2 呈负相关, 与 PIK3CA 和 NTRK1 表达无相关性。本研究通过 RNA 干扰和 CCK-8 法发现敲减 LINC00504 的表达可抑制

MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞的增殖。该结果与前期报道^[13-14]的研究结果一致, 抑制 LINC00504 的表达可抑制三阴性乳腺癌的发生发展。根据分子分型 (ER、PR 和 Her2 的表达), 乳腺癌可分为 luminal A

型、luminal B型、Her2型和Basal样型。Basal样型因ER、PR和Her2的表达均为阴性而被称为三阴性乳腺癌。三阴性乳腺癌是乳腺癌中预后最差的一种^[6]。LINC00504有可能是三阴性乳腺癌靶向治疗的潜在靶点。

本研究通过生信分析明确了LINC00504在乳腺癌组织中呈高表达,并与患者DFS较长相关,敲减LINC00504的表达可抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖,其可能的机制是调控氨基酸代谢和糖酵解/糖异生,该结果为明确LINC00504在乳腺癌发生发展中的作用提供了实验证据。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [2] BALIU-PIQUÉ M, PANDIELLA A, OCANA A. Breast cancer heterogeneity and response to novel therapeutics[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3271[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33167363/>. DOI:10.3390/cancers12113271.
- [3] CRUDELE F, BIANCHI N, REALI E, *et al.* The network of non-coding RNAs and their molecular targets in breast cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 61[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32188472/>. DOI:10.1186/s12943-020-01181-x.
- [4] WANG M H, LIU H L, WU W Y, *et al.* Identification of differentially expressed plasma lncRNAs as potential biomarkers for breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2022, 22(2): e135-e141. DOI:10.1016/j.clbc.2021.05.003.
- [5] ZHONG G B, LIN Y S, WANG X, *et al.* H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-130a-3p/SATB1 in breast cancer cells[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12501-12513[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33324070/>. DOI:10.2147/OTT.S280142.
- [6] SHIH C H, CHUANG L L, TSAI M H, *et al.* Hypoxia-induced MALAT1 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells by sponging miR-3064-5p[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 658151[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34012919/>. DOI:10.3389/fonc.2021.658151.
- [7] SHI P F, ZHANG J M, LI X, *et al.* Long non-coding RNA NORAD inhibition upregulates microRNA-323a-3p to suppress tumorigenesis and development of breast cancer through the PUM1/eIF₂ axis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(13): 1295-1307. DOI: 10.1080/15384101.2021.1934627.
- [8] MENG D F, SHAO H, FENG C B. LINC00894 enhances the progression of breast cancer by sponging miR-429 to regulate ZEB1 expression[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 3395-3407 [2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34079285/>. DOI: 10.2147/OTT.S277284.
- [9] QIAO Y N, JIN T, GUAN S D, *et al.* Long non-coding RNA Lnc-408 promotes invasion and metastasis of breast cancer cell by regulating LIMK1[J]. *Oncogene*, 2021, 40(24): 4198-4213. DOI: 10.1038/s41388-021-01845-y.
- [10] GAO J, YUAN Y, ZHANG L L, *et al.* Inhibition of ZEB1-AS1 confers cisplatin sensitivity in breast cancer by promoting microRNA-129-5p-dependent ZEB1 downregulation[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 90[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32210737/>. DOI:10.1186/s12935-020-1164-8.
- [11] HAN M L, QIAN X K, CAO H, *et al.* lncRNA ZNF649-AS1 induces trastuzumab resistance by promoting ATG5 expression and autophagy[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(11): 2488-2502. DOI:10.1016/j.yvthe.2020.07.019.
- [12] ZHANG Z. Silencing LINC00504 inhibits cell proliferation, invasion as well as migration and promotes cell apoptosis in lung cancer cells via upregulating miR-876-3p[J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(6): 807-817. DOI:10.1007/s10616-020-00424-5.
- [13] MATHIAS C, GROENEVELD C S, TREFFLICH S, *et al.* Novel lncRNAs co-expression networks identifies LINC00504 with oncogenic role in luminal A breast cancer cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2420[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33670895/>. DOI:10.3390/ijms22052420.
- [14] YU H, DONG L Q, WANG H Y, *et al.* LINC00504 promotes the malignant biological behavior of breast cancer cells by upregulating HMGB3 via decoying microRNA-876-3p[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 1803-1815[2022-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654429/>. DOI:10.2147/CMAR.S276290.
- [15] FENG J F, MA J, LIU S Q, *et al.* A noncoding RNA LINC00504 interacts with c-Myc to regulate tumor metabolism in colon cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14725-14734. DOI: 10.1002/jcb.28733.
- [16] LIU Y, HE X C, CHEN Y L, *et al.* Long non-coding RNA LINC00504 regulates the Warburg effect in ovarian cancer through inhibition of miR-1244[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 464(1/2): 39-50. DOI:10.1007/s11010-019-03647-z.

[收稿日期] 2022-01-27

[修回日期] 2022-07-16

[本文编辑] 向正华,沈志超