DOI:10.16016/j.2097-0927.202303100

LINC00294 通过 AKT/mTOR/HIF-1a 通路促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移

杨 婷,王廷睿,韩珊珊,杨钰坪,刘潇蔚,林子晶,史艳玲,肖哲思,明 佳 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院乳腺甲状腺外科

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA)LINC00294 在乳腺癌组织和细胞中的表达变化,及其对乳腺癌细胞生物学特性的影响和可能的机制。**方法** 利用 GEO 数据库资源(GSE45827)中的 41 例乳腺癌组织和 11 例癌旁组织转录组测序数据分析差异基因,采用 qRT-PCR 实验检测 20 对来自本院 2021-2022 年确诊的乳腺癌患者的癌组织和癌旁组织,以及正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A 和人乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3 和 MDA-MB-231 中 LINC00294 的表达;干扰 LINC00294 后采用 CCK-8 检测细胞增殖变化;采用流式细胞术、Western blot 检测细胞凋亡和相关蛋白表达变化;采用划痕实验和 Transwell 检测细胞迁移和侵袭;裸鼠原位成瘤实验检测干扰 LINC00294 对体内肿瘤生长的影响;采用 Western blot 检测干扰 LINC00294 后 AKT/mTOR 通路相关蛋白 p-mTOR、mTOR、p-AKT、AKT 及其下游靶分子缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)的表达情况。**结果** 通过 GEO 数据库筛选出差异表达的基因 LINC00294;LINC00294 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3 和 MDA-MB-231 中表达显著增高($P<0.05$);干扰 LINC00294 后 MCF-7 细胞增殖能力下降、凋亡相关蛋白表达增加、侵袭和迁移能力下降($P<0.05$)。干扰 HIF-1α 可以抑制 LINC00294 的表达($P<0.05$);干扰 LINC00294 后 AKT/mTOR 信号通路中 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白及其下游靶分子 HIF-1α 的表达减少($P<0.05$)。**结论** 乳腺癌中高表达的 LINC00294 可能通过 AKT/mTOR/HIF-1α 信号通路影响乳腺癌的增殖、侵袭和迁移等,LINC00294 可能与乳腺癌的发展密切相关。

[关键词] 长链非编码 RNA;乳腺癌;LINC00294;HIF-1α

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

LINC00294 promotes proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells *via* AKT/mTOR/HIF-1α pathway

YANG Ting, WANG Tingrui, HAN Shanshan, YANG Yuping, LIU Xiaowei, LIN Zijing, SHI Yanling, XIAO Zhesi, MING Jia Department of Breast and Thyroid Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes in the expression of long non-coding RNA (LncRNA) LINC00294 in breast cancer tissues and cells, and investigate its effects and the possible mechanisms on the biological properties of breast cancer cells. **Methods** The differentially expressed genes (DEGs) were analyzed using transcriptome sequencing data from 41 breast cancer tissues and 11 para-cancerous tissues from the Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE45827). Then qRT-PCR assay was used to measure the expression of LINC00294 in 20 pairs of breast cancer and para-cancerous tissues from the breast cancer patients diagnosed in our department, as well as in the normal human breast epithelial MCF-10A cells and the human breast cancer cell lines MCF-7, K-BR-3 and MDA-MB-231. After MCF-7 cells were transfected with lentiviral vector of si-LINC to interfere LINC00294 expression, CCK-8 assay was used to detect cell

[基金项目] 重庆医科大学附属第二医院"宽仁英才"骨干人才项目(KY2019G016);吴阶平医学基金会(320.6750.2021-10-86)

[通信作者] 明 佳,E-mail: mingjia@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

proliferation, flow cytometry and Western blotting were employed to measure cell apoptosis and expression of related proteins, cell scratch assay and Transwell assay were applied to observe cell migration and invasion. Then, the effect of interference with LINC00294 on tumor growth in nude mice model of *in situ* subcutaneous tumorigenesis was observed. The expression of AKT/mTOR pathway-related proteins p-mTOR, mTOR, p-AKT, AKT, and its downstream target molecule HIF-1α was detected by Western blotting. **Results** LncRNA LINC00294 was screened out as a DEG in breast cancer tissues from the GEO database. It was also highly expressed in breast cancer tissues and MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells ($P<0.05$). Interference of LINC00294 resulted in reduced proliferation, enhanced expression of apoptosis-related proteins, and decreased invasion and migration abilities in MCF-7 cells ($P<0.05$). The expression of LINC00294 was inhibited by HIF-1α interference ($P<0.05$), and LINC00294 interference decreased the expression of p-AKT, p-mTOR, mTOR and its downstream target molecule HIF-1α in the AKT/mTOR signaling pathway ($P<0.05$). **Conclusion** High expression of LINC00294 in breast cancer may affect the proliferation, invasion, and migration of breast cancer through the AKT/mTOR/HIF-1α signaling pathway, and LINC00294 may be closely associated with the pathogenesis of breast cancer.

[**Key words**] long non-coding RNA; breast cancer; LINC00294; HIF-1α

Supported by the "Kuanren Yingcai" Backbone Talent Project of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (KY2019G016) and the Wu Jieping Medical Foundation (320.6750.2021-10-86). Corresponding author: MING Jia, E-mail: mingjia@cqmu.edu.cn

乳腺癌是女性常见的高度异质性恶性肿瘤,位居女性常见肿瘤首位。据2021年国际癌症研究机构(international agency for research on cancer,IARC)最新发布的调查数据显示,乳腺癌在全球新发病例高达226万例,并取代肺癌成为了全球第一大癌[1],但乳腺癌发生发展和转移过程中的分子机制仍不清楚。长链非编码RNA(long non-coding RNA,LncRNA)是一类长度大于200 bp的RNA,几乎不具有编码蛋白质的功能[2-3]。LncRNA在肿瘤形成和发展过程中参与多种生物学过程,如增殖、凋亡[4]、侵袭、迁移[5]、耐药[6]、上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)[7]和免疫逃逸[8]等。LncRNA已被证明是潜在的肿瘤诊断和治疗的生物标记物和靶点[9],目前只有极少数的LncRNA具有功能注释,LncRNA如何调控肿瘤的生物学过程值得进一步的研究。本研究通过GEO数据库筛选出乳腺癌中差异表达的LncRNA-LINC00294,运用qRT-PCR检测LINC00294在乳腺癌组织和细胞中的表达,并结合体内外实验研究LINC00294对乳腺癌细胞MCF-7生物学特性的影响及其可能机制,希望为乳腺癌的研究提供新的思路和可能的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 20例乳腺癌组织及癌旁组织样本来自重庆医科大学附属第二医院乳腺甲状腺外科2021-2022年确诊的乳腺癌患者,均未接受放疗、化疗及内分泌等治疗。20例患者均签署知情同意书后进行手术切除,样本立即放于组织稳定保存液中。本研究已获得重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准(2023研伦审第6号)。

1.1.2 细胞 人乳腺癌细胞株MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3和正常人乳腺上皮细胞MCF-10A均购自ATCC细胞库,由重庆医科大学生命科学研究院所保存。

1.1.3 主要试剂 RPMI 1640培养基和DMEM培养基购自美国Thermo Scientific公司;McCoy's 5A培养基和胎牛血清购自以色列BI公司,MCF-10A专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;si-NC、si-LINC00294、si-NC和si-HIF-1α由上海吉玛制药技术有限公司合成;转染试剂Lipofectamine™3000购自美国Invitroge公司;RNA提取试剂盒、Evo M-MLV反转录预混型试剂盒和SYBR Green购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;qRT-PCR实验引物购自北京擎科生物科技有限公司;快速凝胶制备试剂盒购自上海雅酶生物医药公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;β-actin(兔抗,GB15003)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)(兔抗,382600)、PCNA(兔抗,R25294)、Bcl-2(兔抗,R23309)、Bax(兔抗,R23569)、cleaved-Caspase-3(兔抗,R23727)、mTOR(兔抗,380411)、p-mTOR(兔抗,381557)、AKT(兔抗,382804)、p-AKT(兔抗,310021)购自成都正能生物技术有限责任公司;山羊抗兔二抗抗体购自北京中杉金

桥生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 CORNING 公司,结晶紫染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)购自上海碧云天生物技术有限公司;LINC00294 干扰慢病毒及其对照慢病毒购自北京擎科生物科技有限公司;SC-79(HY-18749)购自 MdChemExpress;4~6 周龄、体质量 16~18 g 的 BALB/c 雌性裸鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中;MDA-MB-231 培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中;SK-BR-3 细胞培养于含 10%胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基中。正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A 培养于普诺赛 MCF-10A 细胞专用培养基中。所有细胞株培养于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中。

1.2.2 差异基因筛选 在 GEO 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/)下载 GSE45827(11 例癌旁组织 *vs* 41 例乳腺癌组织)数据集,利用 GEO2R 在线工具(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/)进行差异分析,以 adj. $P<0.05$、$|logFC|>1$ 为标准筛选差异基因,利用 Graph Pad Prism 9.0 绘制热图。

1.2.3 细胞转染 将 MCF-7 细胞培养于 6 孔板中,待细胞生长至 70%~80%时,分为 2 组:si-NC 组和 si-LINC 组,采用 Lipofectamine™3000 将 si-NC 和 si-LINC 分别转染至 MCF-7 细胞。

1.2.4 qRT-PCR 检测 LINC00294 的表达 根据试剂盒说明书提取乳腺癌组织和癌旁组织、正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 SK-BR-3 的总 RNA,并检测其浓度。LINC00294 上游引物序列:5′-TGTGTTGTCCTCCAGAATCG-3′,下游引物序列:5′-CCAACCAAGAGCCAACAAAG-3′;β-actin 上游引物序列:5′-ACCCCGTGCTGCTGAC-3′,下游引物序列:5′-TCCCGGCCAGCCAGG-3′;反应条件为:95 ℃(30 s)→[95 ℃(5 s)→60 ℃(30 s),72 ℃(30 s)]×40 个循环。样品以 β-actin 为内参,设置 3 个复孔,LINC00294 的相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法表示。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 将转染 si-NC 或 si-LINC 24 h 后的 MCF-7 细胞分别制备细胞悬液(3×10^4 个/mL),以 100 μL/孔接种到 96 孔板中,每组设置 4 个复孔。待细胞完全贴壁后记为 0 h,分别在 0、24、48、72、96 h 往每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液后轻柔混匀,培养箱中避光孵育 2 h 后测定 450 nm 处的光密度值[$D(450)$]。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将转染 si-NC 或 si-LINC 的 MCF-7 细胞用胰酶消化后并用 PBS 洗 3 次,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 Annexin 结合液重悬细胞,再加入 10 μL 的 Annexin V-PE,避光孵育 15 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 划痕愈合实验检测细胞迁移 用 200 μL 的枪头对转染 si-NC 或 si-LINC 后培养至 90%的各组 MCF-7 进行划痕,PBS 洗涤 2 次后加入无血清培养基,在显微镜下拍照并记录 0 h 划痕距离。将细胞放回培养箱培养 48 h 后再次用显微镜拍照并记录各组细胞的划痕距离,根据划痕差值计算各组细胞 48 h 的相对迁移率。

1.2.8 Transwell 检测细胞侵袭 将 50 μL 基质胶稀释液(基质胶∶无血清培养基=1∶8)铺于 Transwell 小室中,并将小室放至培养箱中过夜。将各组 MCF-7 细胞用无血清培养基稀释成细胞悬液(2.5×10^5 个/mL),取 200 μL 接种至铺被基质胶的 Transwell 小室上室中,下室加入 500 μL 含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于培养箱中培养。48 h 后取出小室用 PBS 清洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 25 min,结晶紫染色 25 min 后用棉签拭去上室细胞,在显微镜下随机选取 3 个视野拍照并计数细胞。

1.2.9 Western blot 检测蛋白表达 6 孔板中每孔加入 100 μL 细胞裂解液后提取蛋白。每孔按 20 μg 上样,在 SDS-PAGE 凝胶中 150 V 恒压电泳分离蛋白,随后 250 mA 恒流转膜,用 5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,4 ℃孵育一抗(β-actin 兔抗 1∶1 000,PCNA 鼠抗 1∶5 000,Bcl-2 兔抗 1∶500,Bax 兔抗 1∶500,cleaved-Caspase-3 兔抗 1∶500,p-AKT 兔抗 1∶1 000,AKT 兔抗 1∶1 000,p-mTOR 兔抗 1∶1 000,mTOR 兔抗 1∶1 000,HIF-1α 兔抗 1∶500)过夜。TBST 洗膜 3 次,并室温孵育二抗 1 h(辣根酶标记兔抗山羊 IgG 1∶20 000,辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 1∶20 000),再次 TBST 洗膜 3 次,使用勤翔显色仪显色成像并用 Image J 测量灰度值。

1.2.10 转录因子预测 通过 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)获取 LINC00294 启动子序列,应用 JASPAR 数据库(https://jaspar.genereg.net/)预测可能与 LINC00294 启动子序列位点结合的转录因子。

1.2.11 动物实验 将 LINC00294 干扰慢病毒及其对照病毒感染 MCF-7 细胞,培养 48 h 后加入嘌呤霉素筛选稳转株细胞。将稳定转染 LINC00294 干扰慢病毒及其对照慢病毒的 MCF-7 细胞约 1×10^7 个分别悬浮在 200 μL PBS 中,并原位注射到 4~6 周龄 BALB/c 雌性裸鼠的乳腺处,对照组和实验组各 4 只。每周测

量肿瘤大小,用修正椭圆公式(体积=长×宽^2/2)计算肿瘤体积。4 周后,处死小鼠,解剖肿瘤,测定最终肿瘤质量和体积。动物研究项目得到重庆医科大学附属第二医院伦理委员会的批准(2023 研伦审第 6 号)。

1.3 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 9.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,多组均数比较采用方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

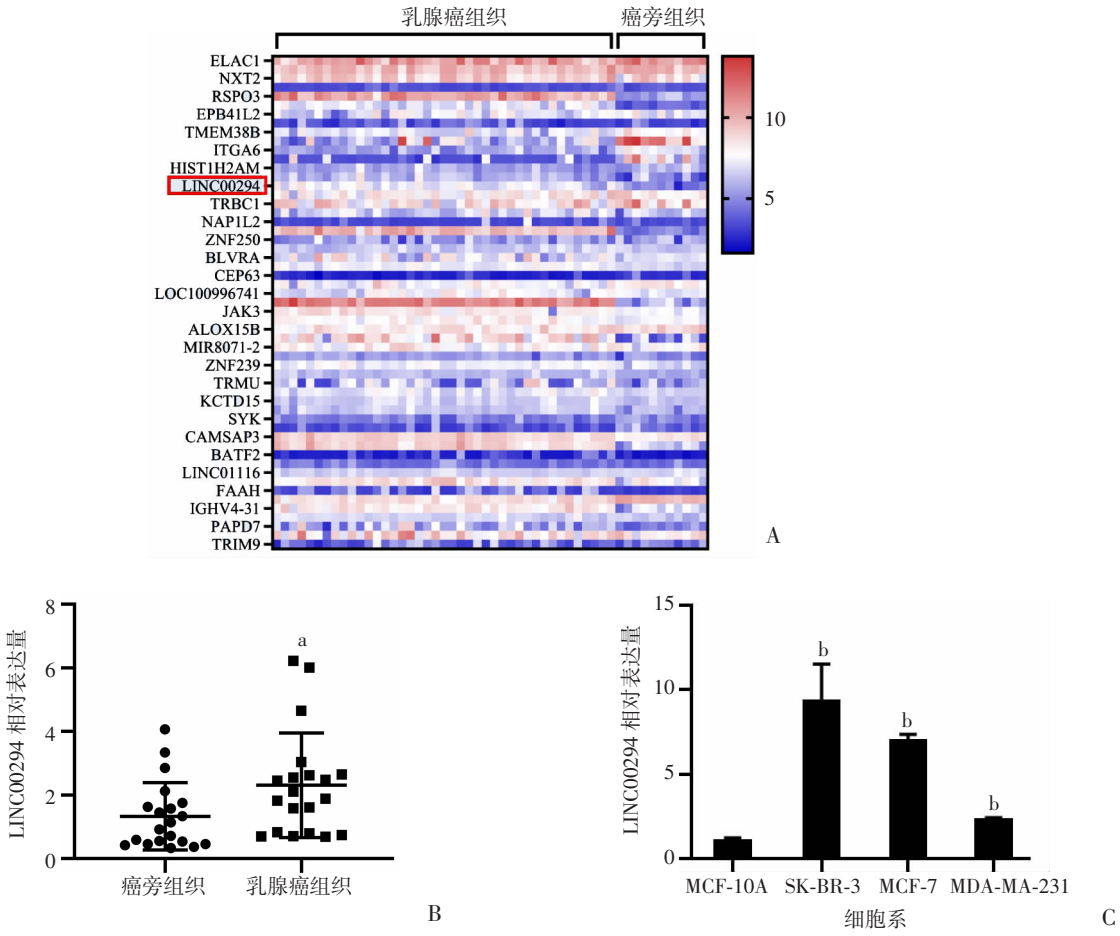
2 结果

2.1 LINC00294 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中高表达

对 GEO 数据库资源(GSE45827)中的 41 例乳腺癌组织和 11 例癌旁组织的转录组测序数据进行分析。结果显示:LINC00294 在乳腺癌组织中显著上调(图 1A)。qRT-PCR 检测 20 对乳腺癌患者的癌组织和癌旁组织、正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3 和 MDA-MB-231 中 LINC00294 的表达,结果显示,LINC00294 在乳腺癌组织中的相对表达量显著高于癌旁组织($P<0.05$,图 1B)。人乳腺癌细胞 SK-BR-3、MCF-7 和 MDA-MB-231 中 LINC00294 的相对表达量明显高于正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A($P<0.05$,图 1C)。该结果与生物信息学分析结果一致,因此选择 LINC00294 进行后续研究。

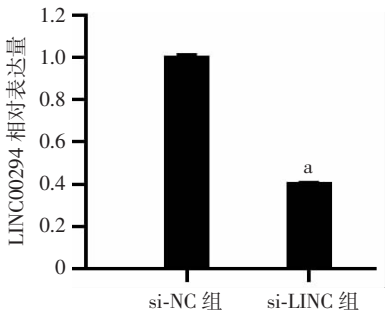
2.2 干扰 LINC00294 效率验证

设计并合成针对 LINC00294 的干扰片段 si-LINC(si-LINC00294)和普通阴性对照 si-NC,探索 LINC00294 对乳腺癌细胞生物学特性的影响。将 si-LINC 和 si-NC 分别转染 MCF-7 细胞 48 h 后,使用 qRT-PCR 检测细胞中 LINC00294 的相对表达水平。结果显示,与 si-NC 组相比,转染 LINC00294 干扰片段后 MCF-7 细胞中 LINC00294 的表达明显降低($P<0.05$,图 2)。



A:GEO 数据库(GSE45827)中部分差异表达的基因;B:不同乳腺组织 qRT-PCR 检测结果($n=20$,$\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与癌旁组织比较;C:不同乳腺细胞系 qRT-PCR 检测结果($n=3$,$\bar{x}\pm s$) b:$P<0.05$,与人乳腺上皮细胞 MCF-10A 比较

图 1 LINC00294 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中高表达



a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 2　干扰 LINC00294 效率验证　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3　干扰 LINC00294 抑制 MCF-7 细胞的增殖并促进细胞凋亡

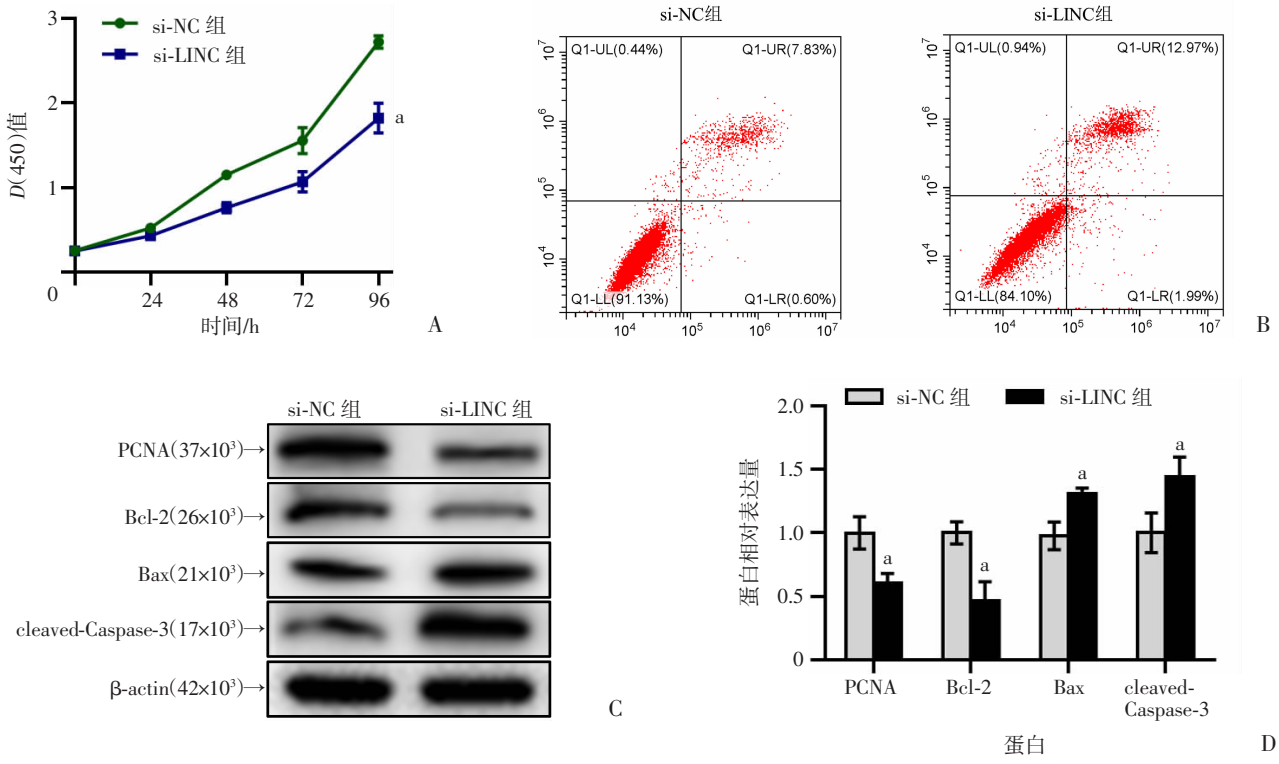
CCK-8 结果显示,培养 96 h 后,与 si-NC 组相比,si-LINC 组 MCF-7 细胞增殖能力显著降低($P<0.05$,图 3A)。流式细胞术检测结果显示,与 si-NC 组相比,干扰 LINC00294 后 MCF-7 细胞的凋亡率增加($P<0.05$,图 3B)。Western blot 检测凋亡相关蛋白发现,与 si-NC 组相比,si-LINC 组增殖细胞核抗原 PCNA 和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达减少,而激活的Caspase-3和促凋亡蛋白 Bax 的表达增加($P<0.05$,图 3C、D)。以上结果表明干扰 LINC00294 显著抑制 MCF-7 细胞的增殖,促进 MCF-7 细胞的凋亡。

2.4　干扰 LINC00294 抑制 MCF-7 细胞的迁移和侵袭

划痕实验结果表明,迁移 48 h 后,与 si-NC 组相比,si-LINC 组 MCF-7 细胞的相对迁移率下降($P<0.05$,图 4A、B)。Transwell 侵袭实验表明,与 si-NC 组相比,si-LINC 组 MCF-7 细胞 48 h 的穿膜数目减少($P<0.05$,图 4C、D)。表明干扰 LINC00294 可以显著抑制 MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力。

2.5　干扰 LINC00294 抑制体内肿瘤的生长

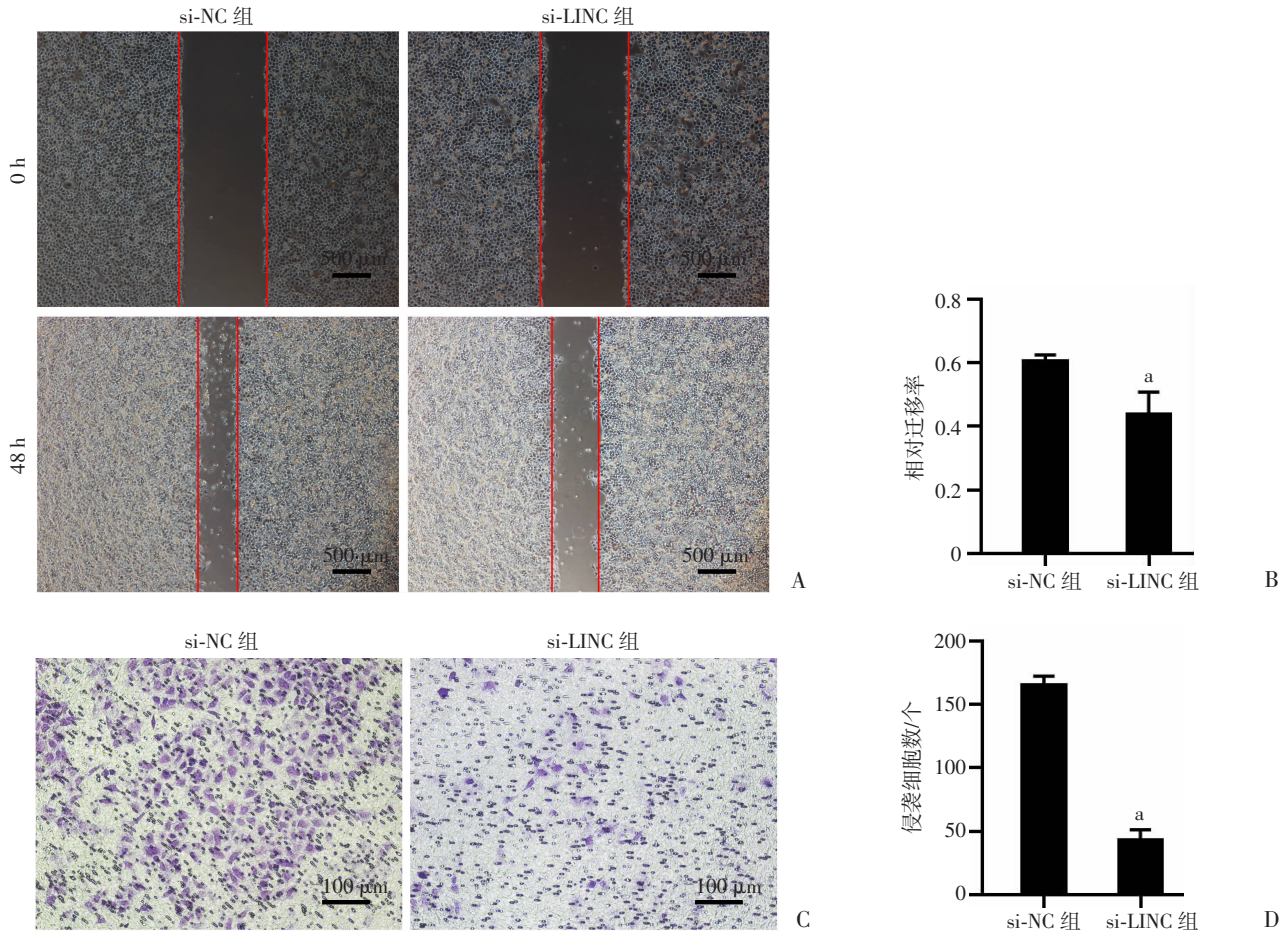
构建裸鼠移植瘤模型验证 LINC00294 在体内对乳腺癌细胞 MCF-7 生长的影响。将 LINC00294 稳定干扰的 MCF-7 细胞(sh-LINC)及其对应的对照组(sh-NC)分别原位注射到雌性裸鼠乳腺处。结果显示,与对照组(sh-NC)相比,干扰 LINC00294(sh-LINC)组的肿瘤体积明显减小($P<0.05$,图 5A、C),肿瘤生长速度减慢($P<0.05$,图 5B),肿瘤质量明显减轻($P<0.05$,图 5D)。表明干扰 LINC00294 抑制体内肿瘤的生长。



a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较

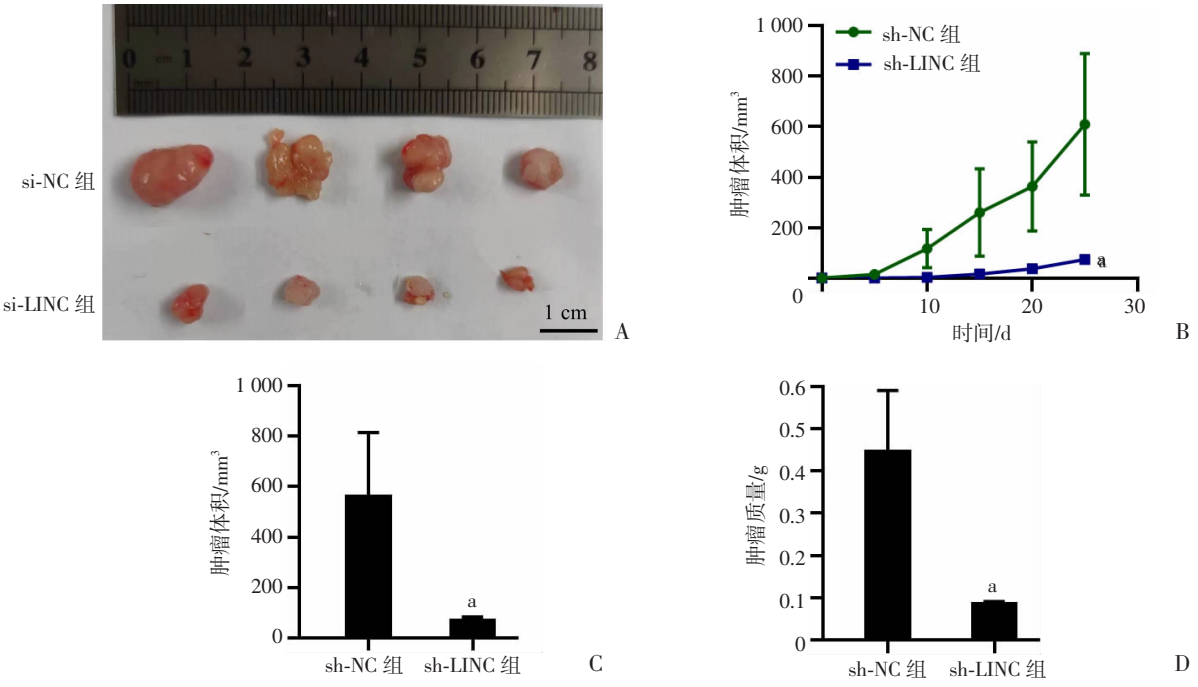
A: CCK-8 检测结果;B:流式细胞术检测结果;C、D: Western blot 检测结果及蛋白相对表达量

图 3　干扰 LINC00294 抑制 MCF-7 细胞的增殖并促进细胞凋亡　($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:划痕实验检测结果;B:各组迁移率比较;C:Transwell 检测结果;D:各组侵袭细胞数比较 a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 4 干扰 LINC00294 抑制 MCF-7 细胞的迁移和侵袭 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 sh-NC 组比较

A:各组移植瘤大体观;B:小鼠不同生长时间肿瘤体积变化;C:处死小鼠后两组肿瘤体积;D:处死小鼠后两组肿瘤质量

图 5 干扰 LINC00294 抑制体内肿瘤的生长 ($n=4,\bar{x}\pm s$)

2.6 HIF-1α 调控 LINC00294 的表达,两者之间可能存在正反馈调节机制

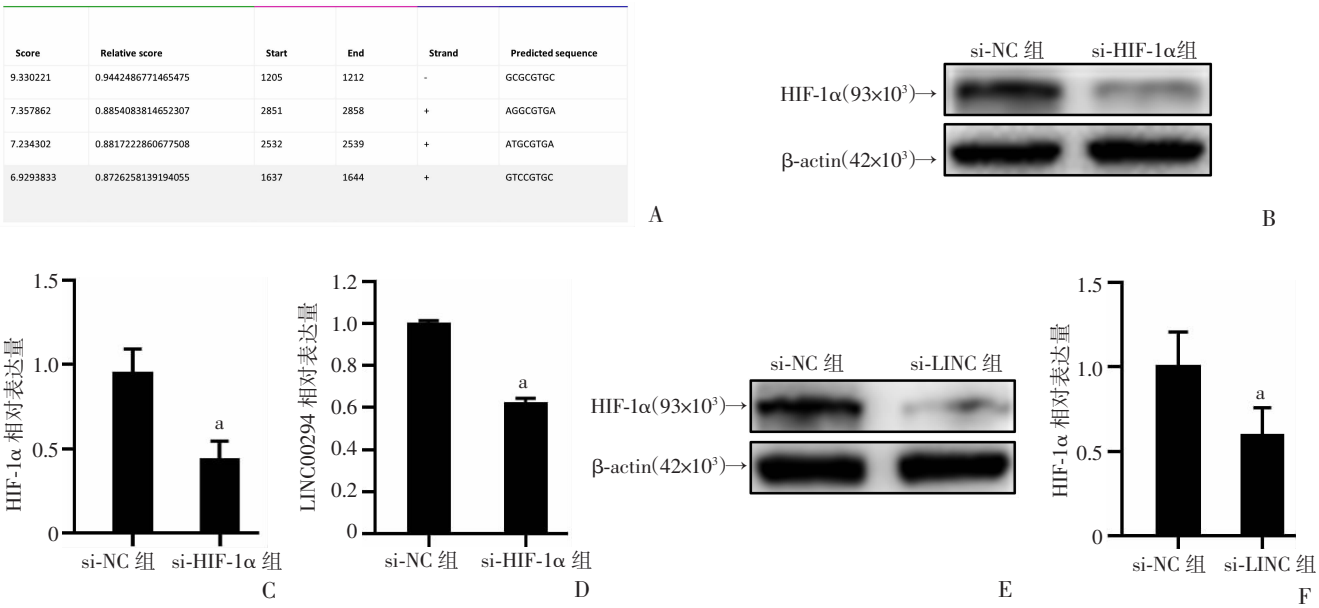
通过 NCBI 数据库获取 LINC00294 启动子序列,启动子区域位点的具体坐标为 Chr11:33074150-33079454。应用 JASPAR 进行转录因子预测,发现 HIF-1α 和 LINC00294 的启动子之间存在可能的结合位点(图 6A)。在 MCF-7 细胞中转染 HIF-1α 的干扰片段 si-HIF-1α 和阴性对照 si-NC,利用 Western blot 检测干扰效率,结果显示,与 si-NC 组相比,si-HIF-1α 组的 HIF-1α 蛋白表达量显著降低($P<0.05$,图 6B、C)。qRT-PCR 检测结果显示,si-HIF-1α 组中 LINC00294 的相对表达量,较 si-NC 组显著下降($P<0.05$,图 6D),表明 HIF-1α 可能调控 LINC00294 的表达。与 si-NC 组相比,干扰 LINC00294 后 HIF-1α 蛋白水平显著下调($P<0.05$,图 6E、F)。提示 LINC00294 也可能影响 HIF-1α 的表达,二者之间可能存在正反馈调控机制。

2.7 LINC00294 可能通过 AKT/mTOR 信号通路调节 HIF-1α 的表达

HIF-1α 被公认为是经典的 AKT/mTOR 通路下游靶点。Western blot 检测干扰 LINC00294 后 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白分子的表达情况,结果显示,与 si-NC 组相比,干扰 LINC00294 后 MCF-7 细胞中 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白的表达量显著降低($P<0.05$,图 7A、B)。在 si-LINC 组中加入 AKT 激活剂 SC-79 设计挽救实验,Western blot 检测发现 SC-79 可以逆转由于干扰 LINC00294 导致的 p-AKT、p-mTOR 和 HIF-1α 蛋白的下降($P<0.05$,图 7C、D)。表明 LINC00294 可能通过 AKT/mTOR 信号通路调节 HIF-1α 的表达,从而调节乳腺癌的发生和发展。

3 讨论

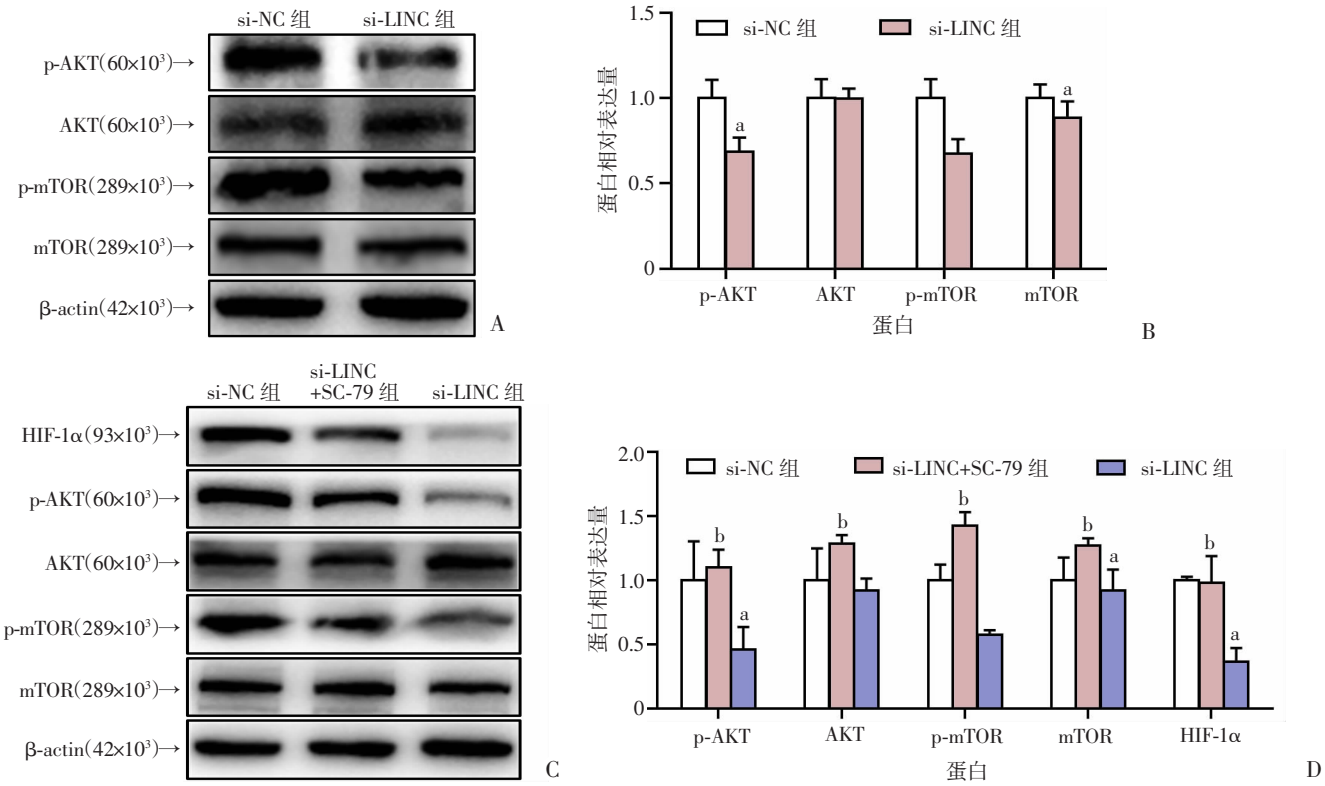
LncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的非编码转录本,由独立启动子 RNA Pol Ⅱ转录,其转录本由多个外显子组成,包括 5'端帽子结构和 3'端 ployA 尾[10-11]。LncRNA 可分为正义 LncRNA、反义 LncRNA、双向 LncRNA、基因间 LncRNA、基因内 LncRNA、启动子相关 RNA 和非翻译区 LncRNA。LncRNA 的作用机制与其亚细胞定位相关[12]。定位于细胞核的 LncRNA 可以干扰临近基因的表达;定位于细胞质的 LncRNA 可以通过 ceRNA 机制竞争性结合 miRNA,解除 miRNA 对靶基因的抑制作用;此外 LncRNA 还可以通过改变蛋白质定位进而调控基因的表达[13]。LncRNA 已被证实在多种肿瘤中发挥重要的调控作用。研究表明乳腺癌中高表达的 LncRNA THOR,在促进乳腺癌发生发展和耐药中发挥了重要的作用[14];LncRNA SFTA1P 在宫颈癌中高表达,其表达水平与宫颈癌的增殖、迁移和侵袭相关[15]。



a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

A:HIF-1α 与 LINC00294 的结合位点分析;B、C:Western blot 检测 si-HIF-1α 的干扰效果及半定量分析;D:qRT-PCR 检测结果;E、F:Western blot 检测干扰 LINC00294 后 HIF-1α 蛋白的表达及半定量分析

图 6 HIF-1α 和 LINC00294 的调控作用 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较;b: $P<0.05$,与 si-LINC 组比较

A、B:Western blot 检测干扰 LINC00294 后 AKT/mTOR 信号通路蛋白的表达及半定量分析;C、D:Western blot 检测加入 AKT 激活剂后各组 AKT/mTOR 信号通路蛋白的表达及半定量分析

图 7 LINC00294 可能通过 AKT/mTOR 信号通路调控 HIF-1α 的表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

本研究中的长链非编码 RNA LINC00294 位于 11 号染色体上(Chr11p13)。研究报道 LINC00294 可以通过海绵化 miR-21-5p 激活 cAMP 信号通路,提高 CASKIN1 的表达,从而抑制线粒体功能,促进胶质瘤细胞凋亡[16]。另外,LINC00294 还可通过靶向 miR-1278/NEFM 轴进而抑制胶质瘤的发展[17];LINC00294 在宫颈癌中的表达升高,并通过 Hedgehog 通路调控细胞周期促进宫颈癌的进展[18]。XU 等[19]发现过表达 LINC00294 可以显著缓解 LPS 诱导的人脐静脉内皮细胞炎症性损伤。LINC00294 已被证实在多种疾病中具有重要的作用,但其在乳腺癌中的作用尚不清楚,LINC00294 在乳腺癌中究竟扮演何种角色值得进一步的研究。

本研究通过 GEO 数据库(GSE45827),对其中 41 例乳腺癌组织及 11 例癌旁组织转录组测序数据进行分析,获得差异表达的 LncRNA-LINC00294。进一步利用 qRT-PCR 技术检测出 LINC00294 在临床乳腺癌组织和乳腺癌细胞 MCF-7、SK-BR-3 和 MDA-MB-231 中呈高表达。这与本研究生物信息学分析结果一致,且目前尚未见 LINC00294 在乳腺癌中的功能注释。为了探索 LINC00294 基因在乳腺癌中的作用,本研究将 si-LINC00294 转染至 MCF-7 细胞中干扰 LINC00294 的表达,结果显示 MCF-7 细胞的增殖能力显著下降,而凋亡增加,说明干扰 LINC00294 能够抑制 MCF-7 细胞的增殖;同时划痕实验和 Transwell 实验显示,干扰 LINC00294 后,MCF-7 细胞的侵袭和迁移能力也显著下降。裸鼠原位成瘤实验显示,干扰 LINC00294 后肿瘤的生长速度减慢,肿瘤体积减小。表明 LINC00294 在乳腺癌中具有促癌的作用。

为进一步探索 LINC00294 调节乳腺癌形成和发展的可能机制,本研究通过 JASPAR 数据库预测发现缺氧诱导因子-1(HIF-1α)和 LINC00294 之间存在可能的结合位点。HIF-1α 是具有转录活性的核蛋白,在缺氧状态下可以与靶基因启动子缺氧反应元件(hypoxia response elements,HRE)的核心 DNA 序列 5′-TACGGTG -3′结合[20],通过激活基因的转录,促进糖酵解、胚胎血管形成、肿瘤血管生成等,在肿瘤的发生发展和转移中发挥重要的作用[21]。此外,HIF-1α 还是 AKT/mTOR 信号通路的下游靶分子,乳腺癌中 PTEN 突变可以通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路

调节 HIF-1α 表达水平[22]。通过干扰 HIF-1α 的表达,发现 LINC00294 的表达水平显著降低,说明 HIF-1α 可能调节 LINC00294 的表达;而干扰 LINC00294 后 Western blot 检测发现 AKT/mTOR 通路信号相关蛋白及其下游靶分子 HIF-1α 的表达水平均显著降低,挽救实验显示 AKT 激活剂 SC-79 可以逆转干扰 LINC00294 对 AKT/mTOR 信号通路的抑制作用。这提示 LINC00294 可能通过 AKT/mTOR 信号通路调节 HIF-1α 的表达,从而影响乳腺癌的发生发展。表明 LINC00294 在乳腺癌的发生发展过程中可能发挥重要作用,且与 HIF-1α 相互调控表达。

AKT/mTOR 信号通路在包括乳腺癌在内的癌症发展中起着至关重要的作用[23]。该通路是细胞代谢的关键调节因子,参与葡萄糖摄取、糖酵解、脂肪酸氧化和蛋白质合成等。肿瘤细胞中 AKT/mTOR 信号过度激活可以引起 mRNA 转录和蛋白质合成增加,从而促进细胞增殖和生长[24]。mTOR 信号通路受非编码 RNA 的调节。PETN 是人类癌症中常见的 AKT/mTOR 信号通路的负调节因子[25],LncRNA p21 可以通过抑制 PTEN 蛋白表达上调 AKT/mTOR 信号通路中 p-AKT 水平[24]。三阴性乳腺癌中高表达的 LINC01133 可以与 RNA 结合蛋白 hnRNPA2B1 竞争性偶联,解除 hnRNPA2B1 对 PRR5/PROTOR1 mRNA 稳定性的抑制,从而加速 AKT 激活,促进 AKT 和 p-AKT 的表达[26];另外,WU 等[27]发现 LncRNA-PAGBC 可以促进胆囊癌细胞的生长,其通过竞争性结合 miR-133b 和 miR-511 以上调 SOX4 和 PIK3R3 的表达,从而激活 AKT/mTOR 通路。

综上所述,本研究发现 LINC00294 在乳腺癌组织和细胞中表达增高,干扰 LINC00294 显著抑制了乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖、侵袭和迁移,增加凋亡,动物实验发现干扰 LINC00294 显著抑制体内乳腺癌的生长,表明 LINC00294 在乳腺癌中呈高表达且具有促癌作用;生信筛选结合 Western blot 等实验发现 HIF-1α 可以调节 LINC00294 的表达,而 LINC00294 可以通过 AKT/mTOR 信号通路调节 HIF-1α 的表达,提示 HIF-1α 和 LINC00294 之间可能存在正反馈调节机制。本研究揭示了 LINC00294 在乳腺癌中的作用和可能机制,但 HIF-1α 与 LINC00294 之间是如何互相调控表达的尚不完全清楚,两者之间具体的分子作用机制仍有待进一步研究。

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. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] WANG J, TAN L R, YU X T, *et al*. LncRNA ZNRD1-AS1 promotes malignant lung cell proliferation, migration, and angiogenesis via the miR-942/TNS1 axis and is positively regulated by the m^6A reader YTHDC2[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 229. DOI: 10.1186/s12943-022-01705-7.

[3] 罗毅, 房晓瑜, 谢薇佳, 等. 长链非编码 RNA LINC02163 在肝细胞肝癌中表达上调并促进肝癌细胞迁移和侵袭[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(1): 81-87. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907251.
LUO Y, FANG X Y, XIE W J, *et al*. Long non-coding RNA LINC02163 is up-regulated and promotes cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(1): 81-87. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907251.

[4] CAI H Z, XU H F, LU H C, *et al*. LncRNA SNHG1 facilitates tumor proliferation and represses apoptosis by regulating PPARγ ubiquitination in bladder cancer[J]. Cancers, 2022, 14(19): 4740. DOI: 10.3390/cancers14194740.

[5] FAN C N, WANG Q, KUIPERS T B, *et al*. LncRNA LITATS1 suppresses TGF-β-induced EMT and cancer cell plasticity by potentiating TβRI degradation[J]. EMBO J, 2023, 42(10): e112806. DOI: 10.15252/embj.2022112806.

[6] PAN Y H, LU X X, SHU G N, *et al*. Extracellular vesicle-mediated transfer of LncRNA IGFL2-AS1 confers sunitinib resistance in renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2023, 83(1): 103-116. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3432.

[7] ZHANG C X, JIFU E, YU E D. LncRNA CASC21 induces HGH1 to mediate colorectal cancer cell proliferation, migration, EMT and stemness[J]. RNA Biol, 2021, 18(sup1): 369-381. DOI: 10.1080/15476286.2021.1950464.

[8] ZHANG M, WANG N, SONG P, *et al*. LncRNA GATA3-AS1 facilitates tumour progression and immune escape in triple-negative breast cancer through destabilization of GATA3 but stabilization of PD-L1[J]. Cell Prolif, 2020, 53(9): e12855. DOI: 10.1111/cpr.12855.

[9] FENG C J, ZHAO Y, LI Y J, *et al*. LncRNA MALAT1 promotes lung cancer proliferation and gefitinib resistance by acting as a miR-200a sponge[J]. Arch De Bronconeumología, 2019, 55(12): 627-633. DOI: 10.1016/j.arbres.2019.03.026.

[10] YU Y, LV F, LIANG D, *et al*. HOTAIR may regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion of MCF-7 cells through regulating the P53/Akt/JNK signaling pathway

[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 555-561. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.054.

[11] 杨鑫, 陈力. 敲低长链非编码 RNA GK-IT1 抑制食管鳞状癌细胞增殖和促进凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(2): 146-155. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008083.
YANG X, CHEN L. Knock-down of long non-codingRNA GK-IT1 inhibits proliferation and promotes apoptosis in esophageal carcinoma cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(2): 146-155. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202008083.

[12] SLACK F J, CHINNAIYAN A M. The role of non-coding RNAs in oncology[J]. Cell, 2019, 179(5): 1033-1055. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.017.

[13] LIU S Q, SUN Y, HOU Y X, *et al*. A novel lncRNA ROPM-mediated lipid metabolism governs breast cancer stem cell properties[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 178. DOI: 10.1186/s13045-021-01194-z.

[14] HU H T, ZHANG H Q, XING Y, *et al*. The lncRNA *THOR* interacts with and stabilizes hnRNPD to promote cell proliferation and metastasis in breast cancer[J]. Oncogene, 2022, 41(49): 5298-5314. DOI: 10.1038/s41388-022-02495-4.

[15] LUO A R, LAN X X, QIU Q Z, *et al*. LncRNA SFTA1P promotes cervical cancer progression by interaction with PTBP1 to facilitate TPM4 mRNA degradation[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 936. DOI: 10.1038/s41419-022-05359-7.

[16] DONG X G, PI Q, YUEMAIERABOLA A, *et al*. Silencing LINC00294 restores mitochondrial function and inhibits apoptosis of glioma cells under hypoxia *via* the miR-21-5p/CASKIN1/cAMP axis[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2021, 2021: 1-21. DOI: 10.1155/2021/8240015.

[17] ZHOU X K, LV L, ZHANG Z Y, *et al*. LINC00294 negatively modulates cell proliferation in glioma through a neurofilament medium-mediated pathway *via* interacting with miR-1278[J]. J Gene Med, 2020, 22(10): e3235. DOI: 10.1002/jgm.3235.

[18] QIU J N, ZHOU S L, CHENG W J, *et al*. LINC00294 induced by GRP78 promotes cervical cancer development by promoting cell cycle transition[J]. Oncol Lett, 2020, 20(5): 1. DOI: 10.3892/ol.2020.12125.

[19] XU J C, FENG H, MA L, *et al*. Bakkenolide-Ⅲa ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human umbilical vein endothelial cells by upregulating LINC00294[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 377. DOI: 10.3892/mmr.2021.12016.

[20] UCARYILMAZ METIN C, OZCAN G. The HIF-1α as a potent inducer of the hallmarks in gastric cancer[J]. Cancers, 2022, 14(11): 2711. DOI: 10.3390/cancers14112711.

[21] MULTHOFF G, VAUPEL P. Hypoxia compromises anti-cancer immune responses[M]// Oxygen Transport to Tissue XLI. Cham: Springer, 2020: 131-143. 10.1007/978-3-030-34461-0_18.

[22] LIU Q, GUAN C C, LIU C, *et al*. Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha: a new strategy for triple-negative breast cancer therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156: 113861. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113861.

[23] YU L, WEI J, LIU P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 69-94. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.06.019.

[24] WANG X H, XU Y Z, WANG X J, *et al*. LincRNA-p21 suppresses development of human prostate cancer through inhibition of PKM2[J]. Cell Prolif, 2017, 50(6): e12395. DOI: 10.1111/cpr.12395.

[25] LI Y, TSANG C K, WANG S H, *et al*. MAF_1 suppresses AKT-mTOR signaling and liver cancer through activation of PTEN transcription[J]. Hepatology, 2016, 63(6): 1928-1942. DOI: 10.1002/hep.28507.

[26] TU Z B, HU Y, RAIZADA D, *et al*. Long noncoding RNA-mediated activation of PROTOR1/PRR5-AKT signaling shunt downstream of PI3K intriple-negative breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(43): e2203180119. DOI: 10.1073/pnas.2203180119.

[27] WU X S, WANG F, LI H F, *et al*. LncRNA-PAGBC acts as a microRNA sponge and promotes gallbladder tumorigenesis[J]. EMBO Rep, 2017, 18(10): 1837-1853. DOI: 10.15252/embr.201744147.

(收稿:2023-03-15;修回:2023-05-24)

(编辑 汪勤俭)