

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.05.001

· 基础研究 ·

LNCRNA FAR2P1 对乳腺癌细胞增殖迁移和凋亡的影响研究*

吴雪芳 瞿菲 刘谦 卢蓉蓉 黄香 孙春晓 付子毅 殷咏梅[△] 李薇[△]

(南京医科大学第一附属医院肿瘤科 江苏南京 211100)

摘要 目的:探讨新型 LncRNA FAR2P1 在乳腺癌发生发展中的作用和影响。方法:癌症基因组图谱(The cancer genome atlas, TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) 数据库分析 LncRNA FAR2P1 差异表达量。根据 169 例 LncRNA FAR2P1 高表达的乳腺癌患者和 1180 例 LncRNA FAR2P1 低表达患者随访资料,分析 LncRNA FAR2P1 与乳腺癌患者预后的相关性。首先利用实时定量荧光聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 LncRNA FAR2P1 在乳腺癌细胞系(MDA-MB-231、SKBR3)和乳腺正常上皮细胞(MCF-10A)中的表达水平;转染小干扰(si-RNA)获得低表达 FAR2P1 的细胞株,Cell Counting Kit-8(CCK8)实验、EDU 实验、克隆形成评估细胞增殖活力,Transwell 实验探究 FAR2P1 对细胞迁移的影响;通过流式分析 FAR2P1 是否调节细胞凋亡;体内异种成瘤模型评估 FAR2P1 在体内对乳腺癌增殖的调节作用。结果:LncRNA FAR2P1 在 MDA-MB-231、SKBR3 中表达显著升高,并且与乳腺癌患者预后负相关。体外实验表明,敲低 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞中的 FAR2P1 后,细胞的增殖能力和迁移能力减弱,但是凋亡率明显升高。体内异种成瘤模型显示沉默 FAR2P1 相比对照,乳腺癌细胞增殖能力显著降低。结论:LncRNA FAR2P1 在乳腺癌中高表达,并且参与调控乳腺癌增殖、凋亡和迁移。

关键词:长链非编码 RNA;FAR2P1;乳腺癌;增殖;迁移

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)05-801-06

Effect of LNCRNA FAR2P1 on Proliferation, Migration and Apoptosis of Breast Cancer Cells*

WU Xue-fang, QU Fei, LIU Qian, LU Rong-rong, HUANG Xiang, SUN Chun-xiao, FU Zi-yi, YIN Yong-mei[△], LI Wei[△]

(Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the biological role and influence of novel LncRNA FAR2P1 in the tumorigenesis and progress of breast cancer. **Methods:** The cancer genome atlas (TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) database was used to analyze the differential expression of LncRNA FAR2P1. According to the follow-up data of 169 breast cancer patients with high expression of LncRNA FAR2P1 and 1180 breast cancer patients with low expression of LncRNA FAR2P1, the relation between LncRNA FAR2P1 and the prognosis was analyzed. Qrt-pcr was used to explore the expression of LncRNA FAR2P1 in MCF-10a and MDA-MB-231 SKBR3 cells. The effects of FAR2P1 on the proliferation and migration of cells were evaluated by in vitro experiments, such as Cell Counting KIT-8 (CCK8) method, EDU method, clone formation method and Transwell method. Flow cytometry was used to detect whether FAR2P1 regulates the apoptosis process of cells. The regulatory effect of FAR2P1 on cell proliferation in vivo was further investigated. **Results:** The expression of LncRNA FAR2P1 is obviously increased in breast cancer tissues and cell line MDA-MB-231 SKBR3, and is negatively relate with the prognosis of patients. Compared with the control, the silencing FAR2P1 significantly reduced the proliferation and migration ability of MDA-MB-231 and SKBR3, but improved the proportion of apoptosis. In vivo xenogenic tumor model showed that silencing FAR2P1 markedly decreased the proliferation ability of breast cancer compared with the control groups. **Conclusion:** LncRNA FAR2P1 is highly expressed in breast cancer and plays an important role in regulating the proliferation, apoptosis and migration of breast cancer.

Key words: Long non-coding RNA; FAR2P1; Breast cancer; Proliferation; Migration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)05-801-06

前言

乳腺癌是目前女性最常患的恶性肿瘤^[1],据统计,2020 年

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772475);江苏省自然科学基金面上项目(BK20191355)

作者简介:吴雪芳(1997-),女,硕士,主要研究方向:RNA 组学与乳腺癌,E-mail: 15736998733@163.com

[△] 通讯作者:殷咏梅(1969-),女,教授,主要研究方向:乳腺癌转化医学研究,E-mail: ymyin@njmu.edu.cn;

李薇(1979-),女,教授,主要研究方向:乳腺癌和肺癌的临床和转化医学研究,E-mail: liwei7769@163.com

(收稿日期:2022-09-25 接受日期:2022-10-21)

全球乳腺癌在所有肿瘤中发病率位居第一位;而我国乳腺癌的发病率也居首位,死亡例数位居第四位,对女性生命健康产生了严重的不良影响^[2]。乳腺癌通常可以分为 Luminal A 型、Luminal B 型、三阴型及 HER2 过表达型四种类型^[3]。近几十年来,乳腺癌的各种治疗方法得到了飞快的发展,如放化疗、靶向治疗、内分泌治疗以及手术等方法显著提高了患者的生存率,但局部进展及转移对于乳腺癌治疗来说仍是巨大挑战^[4],约有 20-30% 的乳腺癌患者在确诊时已经发生转移,而且乳腺癌转移后会严重影响患者的预后^[5]。因此探究乳腺癌发生发展过程,寻找新的诊断和治疗方法,将会使广大乳腺癌患者受益更多。

长链非编码 RNA(Long non-coding RNAs, LncRNAs)是长度超过 200 个碱基的转录本,并且几乎无法编码蛋白质^[6]。越来越多的研究表明,LncRNAs 在转录调控、mRNA 加工和核结构域组织等方面具有重要生物学作用^[7,8],并可参与肿瘤的发生和进展^[9],还可作为生物标志物参与判断肿瘤的预后等^[10-13]。例如,LncRNA cas9 可通过上调 TGFβ2 促进膀胱癌细胞增殖和上皮细胞间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[14]。LncRNA CASC8 通过上调 hnRNPL 促进食管鳞状细胞癌的增殖和化疗耐药^[15]。LncRNA AFAP1-AS1 可促进肺癌细胞的迁移和侵袭等^[16]。因此研究 LncRNA 在肿瘤发生发展中的作用对于肿瘤患者的治疗和改善患者预后都具有重要意义。

LncRNA FAR2P1 来源于假基因,位于人类第 2 号染色体,其转录本长 4541 bp。目前尚未有报道关于 FAR2P1 的研究。本研究首先通过 TCGA 数据库发现了 LncRNA FAR2P1 在乳腺癌中上调并且对于乳腺癌患者预后具有不良影响,检测 FAR2P1 在细胞中的表达水平,结果显示乳腺癌细胞相比正常乳腺上皮细胞表达更高。再通过构建小干扰敲低 FAR2P1 的表达水平,在细胞增殖、凋亡和迁移方面探讨 FAR2P1 如何调控乳腺癌细胞。最后通过体内异种移植模型探讨 FAR2P1 在体内对于乳腺癌细胞增殖的影响,以期对乳腺癌患者探索更多的诊断或者治疗方法,改善他们的生存率和预后。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞系(MDA-MB-231、SKBR3)及正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)所用的 DMEM 培养基购买于 gibco (上海,中国);血清购买于 NEWZERUM(新西兰);TRIzol 试剂和转染试剂购买于 Invitrogen (上海,中国);逆转录及实时定量 PCR 试剂盒、凋亡试剂盒购买于 vazyme(南京,中国);CCK8 试剂盒购买于 MedChemExpress(上海,中国);EDU 试剂盒购买于瑞博(苏州,南京)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 MDA-MB-231、SKBR3 及 MCF-10A 细胞置于 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中,培养基为 90% DMEM,10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素。细胞均匀铺于培养皿中,培养基每 2 天更换一次;当细胞密度达到 80%时,弃去培养基,PBS 洗两遍,加入胰酶放入培养箱消化 1 分钟,完全培养基终止消化后收集到离心管内,离心弃去上层清液加入新鲜培养基,按照一定比例进行传代。将细胞铺于六孔板,当密度达到 70%左右时进行转染,具体步骤如下:无酶 EP 管内分别

加入 250 μL Opti-MEM,然后根据细胞密度加入 8-10 μL siRNA(NC 组不加 siRNA),对应的 EP 管内加入等体积的 Lipofectamine 2000,混匀后室温静置 5 分钟;混合两管内的稀释液,轻轻吹打混匀后置于室温 20 分钟;然后将混合液加到六孔板中,每孔 500 μL 混合液,再分别加入 1.5 mL Opti-MEM,轻轻摇晃六孔板使液体混匀后置于培养箱,6 小时后换成新鲜完全培养基。转染 24 小时后,收集细胞进行细胞表型实验、qPCR 实验等。

1.2.2 实时定量荧光聚合酶链反应 提取细胞 RNA,步骤如下:培养皿内加入 1 mL Trizol 试剂,室温静置 5 分钟后收集到 EP 管内;再加入 200 μL 氯仿,摇晃后静置 5 分钟;12000 转/分钟(4℃,离心 15 分钟),轻轻吸取上清液加入新的 EP 管内,再加入预冷的相同体积异丙醇,静置 10 分钟;12000 转/分钟(4℃,离心 12 分钟),留下沉淀后加入 1 mL 75%乙醇,上下摇晃 EP 管使沉淀充分洗涤;7500 转/分钟(4℃,离心 5 分钟),吸掉上清,开盖晾干后加入一定量 RNA-free 水溶解 RNA,吹吸混匀后用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。设计并合成 LncRNA FAR2P1 和内参 GAPDH 的引物(表 1)。逆转录所提取的 RNA,然后进行 qRT-PCR 实验,反应总体积为 10 μL (ddH₂O 3.6 μL、模板 cDNA 1.0 μL、上游和下游引物各 0.2 μL、SYBR 5.0 μL)。

表 1 相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of related genes

Sequences	
FAR2P1	forward: 5'-TACAGCCGTCATCTCCAC-3'
	reverse: 5'-GTACCAGGAACTTCCCCACA-3'
GAPDH	forward: 5'-GGGAGCCAAAAGGGTCAT-3'
	reverse: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3'

1.2.3 CCK8 实验 转染 24 小时后的细胞吸掉原培养基,清洗消化后收集细胞,计数后将细胞铺到 96 孔板中,每组 6 个复孔,每孔约 2000-3000 个细胞,每孔总体积为 200 μL。置于培养箱连续培养 5 天,每天同一时间取一块板弃去原培养基,每孔加入 100 μL CCK8 稀释液(完全培养基:CCK8 试剂=9:1),孵育 2 小时后,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.2.4 平板克隆形成实验 转染 24 小时后的细胞消化下来,离心重悬并计数,细胞(1000-1500 个/孔)接种于六孔板中,每孔加入 2 mL 培养基,各组 3 个复孔;每天注意观察克隆形成状态,每 7 天换一次新鲜培养基,培养 10-14 天;当培养皿中的细胞克隆斑点肉眼可见时,弃去培养基终止培养。每孔加入 1 mL PBS 清洗 1-2 次,然后加入 1 mL 甲醇固定 30 分钟后,再用结晶紫染色 30 分钟,最后用 PBS 清洗六孔板后自然风干,用相机拍照并进行计数。

1.2.5 胸腺嘧啶核苷类似物(EdU)细胞增殖实验 首先将 24 孔板中铺上细胞爬片,将细胞分别接种于铺了爬片的 24 孔板内,每组 4 个复孔。24 小时后转染细胞,6 小时后换液。转染 24 小时后,弃掉原培养基,每孔加入 300 μL EdU 培养基,37℃孵育 4 h,PBS 清洗 2 次,每次 5 分钟;然后 4%多聚甲醛溶液固定 30 分钟后,加入 200 μL 甘氨酸,摇床孵育 5 分钟,PBS 清洗 5 分钟;加入 200 μL 0.5%Triton X-100,脱色摇床孵育 10 分钟,

PBS 清洗 5 分钟;加入 300 μ L 的 1 $\times$ Apollo 染色反应液,孵育 30 分钟(注意避光);加入 200 μ L 的 0.5 %Triton X-100,于脱色摇床上清洗 2 次,每次 10 分钟;最后每孔加入 200 μ L 的 Hoechst 33342 反应液,孵育 30 分钟(注意避光),PBS 清洗。经荧光显微镜拍照,Image 软件处理后计算两组细胞 EdU 阳性率并作对比。

1.2.6 Transwell 实验 细胞转染 24 小时后消化下来,完全培养基终止消化后离心去除上清,加入不含血清培养基,吹匀细胞并计数,将细胞(10 万个/孔)加入 transwell 小室的上层,下层加入 600 μ L 含 20%胎牛血清的完全培养基,培养 48 小时后,甲醇固定 30 分钟,结晶紫染色 30 分钟,用 PBS 清洗三遍,直至洗去染色液,倒扣晾干。在倒置显微镜下计数下层细胞数目。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞转染 48 小时后收集到流式管内(包括细胞上清液)并吹打混匀,1800 转/分钟(4 $^{\circ}$ C,离心 5 分钟)。加入预冷的 PBS,1800 转/分钟(4 $^{\circ}$ C,离心 5 分钟),吸尽流式管内 PBS。每管加入 100 μ L Binding Buffer 并轻轻吹匀,异硫氰酸荧光素(FITC)-Annexin V 和碘化丙啶各 5 μ L,室温孵育 10 分钟(注意避光)。最加入 400 μ L Binding Buffer,并在 1 小时内送检。

1.2.8 体内异种成瘤模型 雌性 BALB/c 裸鼠(4-5 周龄)购自南京大学模型动物研究中心(南京,中国)。将稳定转染 sh-FAR2P1 或用慢病毒转染空载体的 MDA-MB-231 细胞以 1×10^7 密度分别注射到裸鼠的两侧腋窝皮下,建立移植模型。肿瘤大小每 2 天测量一次并计算肿瘤体积:体积 = 长度 $\times$ 宽度 $\times$ 0.5。接种 16 天后处死小鼠,手术切除肿瘤,拍照并称重,加入 4%多聚甲醛固定。动物伦理和实验程序由南京医科大学机构动物护理和使用委员会批准(批准号为 2206027)。

1.2.9 生物信息学分析方法 数据来源:UCSC XENA (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 经 Toil 流程 (PMID: 28398314)统一处理的 TCGA 和 GTEx 的 TPM 格式的 RNAseq 数据。提取 TCGA 的乳腺浸润癌和对应的正常组织数据。

1.3 统计学分析

每项实验均进行至少三次,所有统计分析均使用 SPSS 20.0 软件(IBM, SPSS, USA)进行,采用学生 t 检验比较组间均数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$,***代表 $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 LncRNA FAR2P1 在乳腺癌中高表达且与患者较差预后相关

通过 TCGA 数据库比较乳腺癌患者癌和癌旁组织中 LncRNA FAR2P1 的表达差异,如图 1A 所示,FAR2P1 在乳腺癌组织中显著高表达。在 148 例高表达 FAR2P1 的乳腺癌患者和 934 例低表达患者中进行预后分析,高表达的患者预后明显更差(图 1B)。此外,qRT-PCR 检测乳腺正常上皮细胞系 MCF-10A 和乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 SKBR3 中 FAR2P1 的表达水平,结果显示 FAR2P1 在乳腺癌细胞系中明显上调,尤其是在 MDA-MB-231 细胞中(图 1C)。因此,我们推测高表达的 LncRNA FAR2P1 可能在乳腺癌中发挥一定调控作用。

2.2 LncRNA FAR2P1 在体外调节乳腺癌细胞的增殖

为了探究 FAR2P1 在乳腺癌细胞中发挥的作用,我们分别用 FAR2P1 1 号和 2 号小干扰分别转染 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞,降低 FAR2P1 的表达,并用 qRT-PCR 方法检测其敲降效率。qRT-PCR 证实 MDA-MB-231 和 SKBR3 中 FAR2P1 均可被小干扰有效沉默,敲低效率最高达到 70 % (图 2A)。CCK8 实验和 EDU 实验结果显示,敲低 FAR2P1 后,MDA-MB-231 和 SKBR3 的增殖活力相比对照组明显降低(图 2B、2C、2E)。克隆形成实验结果,降低 FAR2P1 的表达水平后,乳腺癌细胞的克隆形成能力在一定程度上也被减弱(图 2D)。以上结果证明 LncRNA FAR2P1 对乳腺癌细胞的增殖具有重要作用。

2.3 LncRNA FAR2P1 对乳腺癌细胞凋亡和迁移的影响

肿瘤发生是一个涉及多阶段反应和突变积累的渐进过程。在此过程中,肿瘤细胞越来越不受体内调节机制的控制,过度增殖,或者逃避机体对肿瘤细胞的死亡清除。目前的研究表明,细胞死亡途径主要有凋亡,坏死和焦亡等,其中最主要为凋亡。因此我们接下来利用流式细胞术探究 FAR2P1 对乳腺癌细胞的凋亡是否有影响,结果显示下调 FAR2P1 的表达后,细胞凋亡率明显升高(图 3A)。因此证明在乳腺癌中 LncRNA FAR2P1 对凋亡具有一定抑制作用。接着我们利用 Transwell 实验进一步探索 FAR2P1 对细胞迁移的影响,如图 3B 所示,敲降 FAR2P1 明显抑制迁移水平。

2.4 LncRNA FAR2P1 在体内调节乳腺癌细胞的增殖

为进一步确定 FAR2P1 是否在体内影响乳腺癌发生,将稳定转染 sh-FAR2P1 或对照载体的 MDA-MB-231 细胞分别接种到雌性裸鼠两侧腋窝下(图 4A)。连续检测 16 天肿瘤体积,结果显示,与对照相比,敲低 FAR2P1,肿瘤体积一定程度上减小(图 4B)。16 天后颈椎脱臼法处死小鼠,手术取出肿瘤组织,称量发现 FAR2P1 敲低组的肿瘤平均重量也明显降低(图 4C)。苏木精和伊红染色(HE)及抗 ki-67 抗体免疫组化(IHC)分析显示,与对照组相比,sh-FAR2P1 转染的 MDA-MB-231 细胞形成的肿瘤 Ki-67 阳性率明显下降(图 4D)。这些结果表明,敲除 FAR2P1 可抑制体内肿瘤生长。因此,LncRNA FAR2P1 在体内对于乳腺癌增殖也具有一定调控作用。

3 讨论

近年来,大量研究发现各种类型的肿瘤都和 LncRNA 的上调或者下调有一定关系^[17-19]。这些 LncRNAs 主要通过基因调控影响肿瘤发生发展,如细胞增殖和凋亡、迁移和侵袭等等^[20,21]。Liang 等人发现 LncRNA BCRT1 可以通过靶向激活 miR-1303/PTBP3 轴促进乳腺癌进展^[22]。LncRNA PRNCR1 可以与 miR377 竞争性结合并上调 CCND2,进而激活 MEK/MAPK 通路促进乳腺癌生长^[23]。LncRNA RP11-390F4.3 可被缺氧诱导进而促进肿瘤 EMT 和转移^[24]。因此,加强探索 LncRNA 对肿瘤的影响,或许对于乳腺癌的早发现早诊断、改善患者临床治疗方法都具有重要意义。

本研究中我们发现了一种新型 LncRNA FAR2P1,它是一种假基因来源 LncRNA。假基因被定义为包含有缺陷基因拷贝区域的基因组,它们几乎存在于所有形式的生命中。假基因根

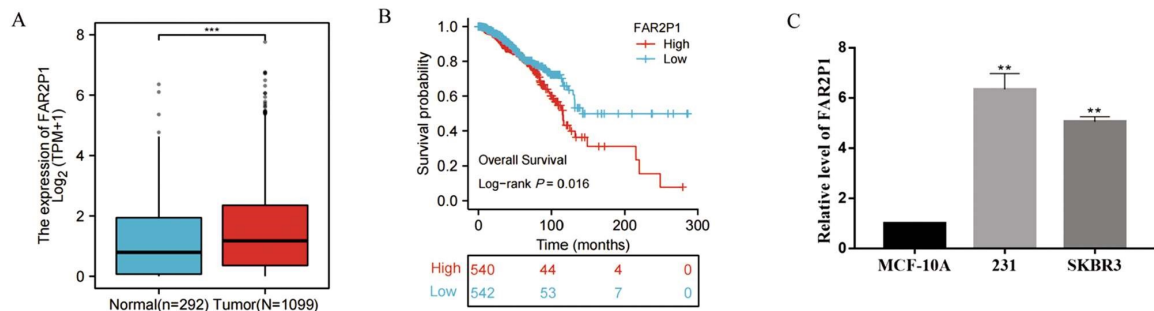


图1 FAR2P1 的表达水平及预后分析

(注:A.在TCGA数据库中乳腺癌组织与正常组织FAR2P1表达水平的分析($P<0.001$);B.Kaplan-Meier生存曲线提示高表达FAR2P1与乳腺癌预后不良相关($P<0.05$);C.FAR2P1在MDA-MB-231、SKBR3和MCF-10A中的表达水平。)

Fig.1 Expression level and prognosis analysis of FAR2P1

(Note: A. Analysis of FAR2P1 expression in breast cancer tissues and normal tissues in TCGA database ($P<0.001$); B. Kaplan-Meier survival curve showed that high expression of FAR2P1 was associated with poor prognosis of breast cancer ($P<0.05$). C. Expression of FAR2P1 in MDA-MB-231, SKBR3 and MCF-10A.)

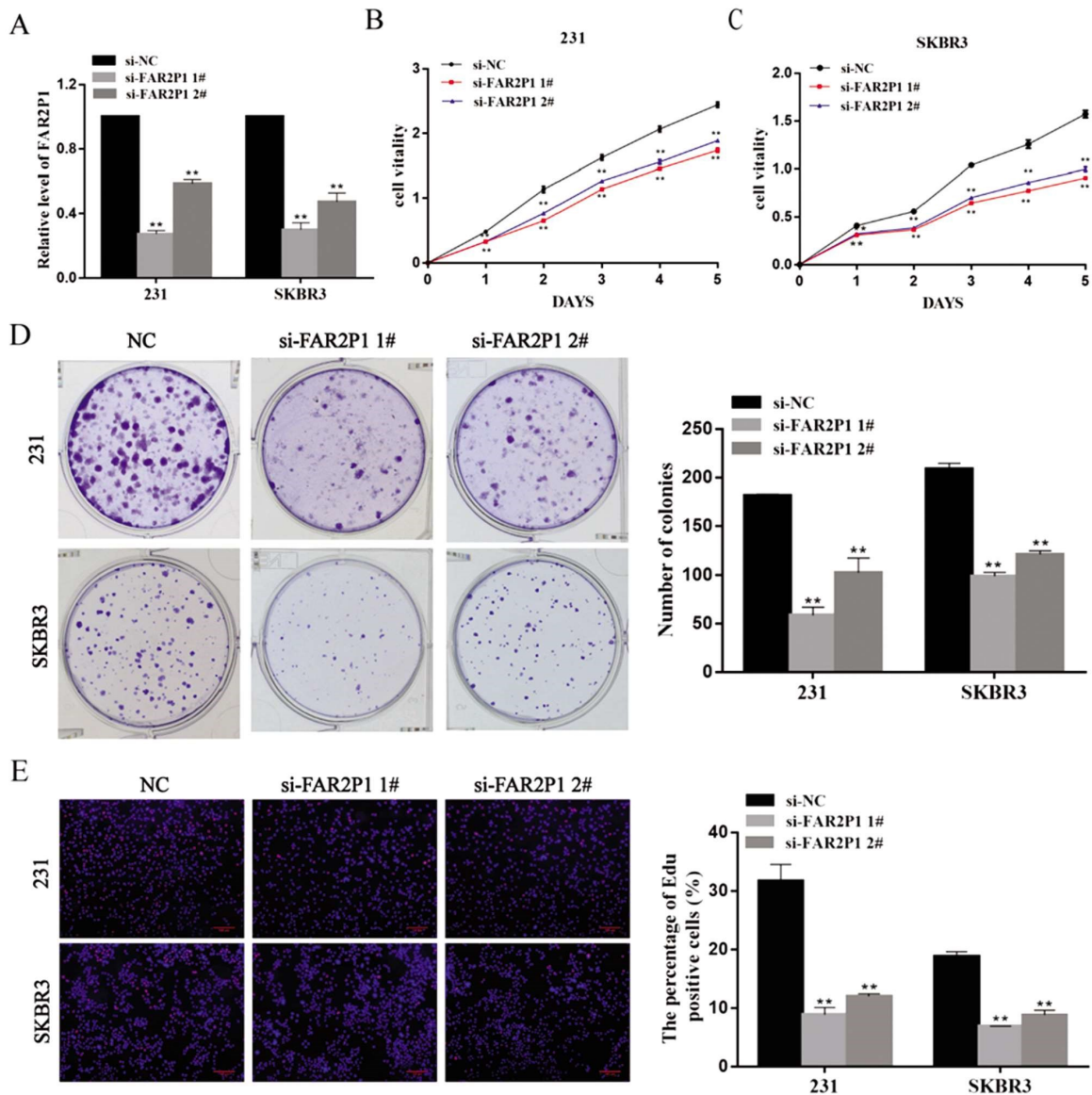


图2 lncRNA FAR2P1 对乳腺癌细胞增殖的影响

(注:A.FAR2P1在乳腺癌细胞中的敲低效率;B-E 对照组和敲低组细胞的CCK8实验、克隆形成实验、EDU实验。)

Fig.2 Effect of lncRNA FAR2P1 on proliferation of breast cancer cells

(Note: A. FAR2P1 knockdown efficiency in breast cancer cell lines; B-E. CCK8, clone formation assay and EDU assay of control group and knockdown group cells.)

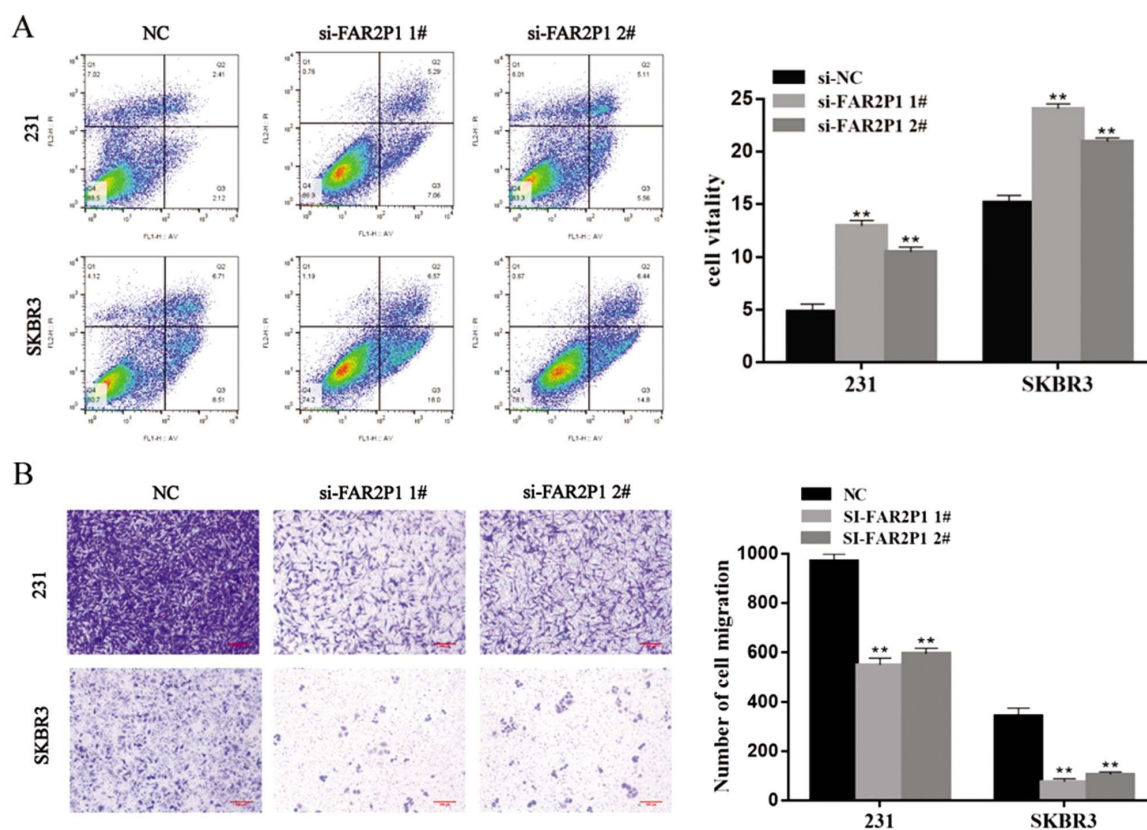


图3 lncRNA FAR2P1 对细胞凋亡和迁移的影响

(注:A.流式检测对照组和敲低组细胞的凋亡;B. Transwell 实验检测对照组和敲低组细胞的迁移。)

Fig.3 Effect of lncRNA FAR2P1 on apoptosis and migration of cells

(Note: A. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of cell lines in control group and knockdown group;

B. Transwell assay to detect the migration of cell lines in control group and knockdown group.)

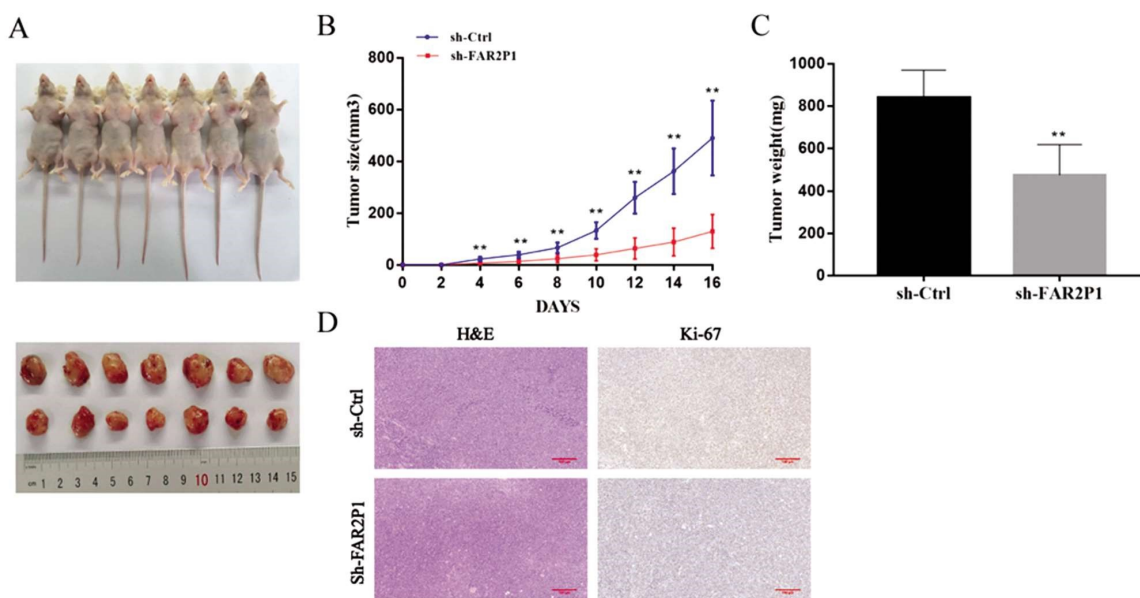


图4 lncRNA FAR2P1 在体内调节乳腺癌细胞的增殖

(注:A.在小鼠体内剖出的瘤子;B、C.转染 sh-FAR2P1 和 sh-ctrl 的小鼠的肿瘤体积和重量;D.小鼠组织 HE 染色和免疫组化染色。)

Fig.4 lncRNA FAR2P1 regulates the proliferation of breast cancer cells in vivo

(Notes: A. Tumors dissected in mice; B, C. Tumor volume and weight of mice transfected with sh-FAR2P1 and sh-ctrl;

D. HE staining and immunohistochemical staining of mouse tissues.)

据它的产生方式通常分为复制假基因和反座假基因^[25]。既往人们通常认为假基因缺乏功能,但越来越多的研究发现假基因也

发挥着重要的生物学作用^[26]。假基因可以通过多种机制发挥调控作用,如假基因转录本及其反义 RNA 可作为 microRNA

海绵,招募染色质重构因子,结合 RNA 结合蛋白,结合转录因子等方式,调控其亲本基因表达^[27]。假基因的异常表达跟很多疾病相关,如心血管疾病,糖尿病,地中海贫血,神经退行性疾病等^[28-31]。假基因也发挥着调控肿瘤的作用,如 PCNP1 可以促进乙肝病毒复制,从而促进肝细胞癌的肿瘤生长^[32];PTENP1 在胃癌中下调,通过增加 PTEN 的表达抑制胃癌的增殖、迁移、侵袭和促进凋亡^[33]。假基因在乳腺癌中发挥着促癌或抑癌的作用,如 CYP4Z2P 及其亲本基因 CYP4Z1 的 ceRNA 网在乳腺癌中发挥抗凋亡作用并且可以促进他莫西芬耐药^[34];PTENP1 可以通过抑制 AKT 和 MAPK 信号通路抑制乳腺癌的增殖和迁移^[35];在乳腺癌中,STMN1P2 可通过结合 hnRNPU 促进细胞迁移^[36]。而关于 FAR2P1 在肿瘤中的作用既往并没有文献报道,因此我们对 FAR2P1 在乳腺癌中的作用进行探究。首先我们通过 TCGA 数据网站对 FAR2P1 在乳腺癌中的表达水平及预后进行分析,发现其在肿瘤组织中相比癌旁组织表达水平呈现上调,并且 FAR2P1 高表达的患者具有较差的预后。检测细胞中 FAR2P1 的表达,结果显示 FAR2P1 在乳腺癌细胞系中表达更高。因此我们推测 LNCRNA FAR2P1 在乳腺癌恶性进展中可能发挥着重要作用。

接着我们利用 MDA-MB-231 和 SKBR3 细胞对 LncRNA FAR2P1 分别进行了一些体外和体内实验。在乳腺癌细胞中敲低 FAR2P1 的表达,进行 CCK8,EDU,克隆形成以及 transwell 实验,发现敲低 FAR2P1 对于乳腺癌细胞的增殖和迁移能力具有明显抑制作用。流式细胞检测同样显示敲低 FAR2P1 能够促进乳腺癌细胞凋亡能力。小鼠体内成瘤实验显示,sh-FAR2P1 组小鼠相比对照组,肿瘤体积重量及 KI67 阳性细胞数均明显降低。

综上所述,乳腺癌中高表达的 LNCRNA FAR2P1 可促进乳腺癌细胞增殖迁移、抑制凋亡,并可有效阻止异种移植肿瘤的生长。因此 FAR2P1 在乳腺癌中可能发挥着一定重要作用,但具体作用机制目前仍不清楚,还需进一步探索。总之,本研究揭示了一种新型假基因来源 LNCRNA FAR2P1 在乳腺癌中的生物学功能,预示着 FAR2P1 可能成为乳腺癌新的生物标志物和治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Han B, Sha L, Yu X, et al. Identification of dual therapeutic targets assisted by in situ automated DNA assembly for combined therapy in breast cancer[J]. Biosens Bioelectron, 2021, 176: 112913
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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
- [3] 田甜,李尚子,庞慧.乳腺癌内分泌耐药机制及治疗对策的研究进展[J].现代肿瘤医学, 2022, 30(18): 3436-3440
- [4] AlSendi M, O'Reilly D, Zeidan YH, et al. Oligometastatic breast cancer: Are we there yet[J]. Int J Cancer, 2021, 149(8): 1520-1528
- [5] Liang Y, Zhang H, Song X, et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 14-27
- [6] Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045
- [7] Zhao Z, Sun W, Guo Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. Life Sci, 2020, 254: 116900
- [8] Han TS, Hur K, Cho HS, et al. Epigenetic Associations between lncRNA/circRNA and miRNA in Hepatocellular Carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(9): 2622
- [9] Herman AB, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2252-2266
- [10] Smolarz B, Zadrożna-Nowak A, Romanowicz H. The Role of lncRNA in the Development of Tumors, including Breast Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8427
- [11] Yang M, Lu H, Liu J, et al. lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (D1): D1295-D1306
- [12] McCabe EM, Rasmussen TP. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 75: 38-48
- [13] Singh D, Assaraf YG, Gacche RN. Long non-coding RNA mediated drug resistance in breast cancer [J]. Drug Resist Updat, 2022, 63: 100851
- [14] Zhang Z, Chen F, Zhan H, et al. lncRNA CASC9 sponges miR-758-3p to promote proliferation and EMT in bladder cancer by upregulating TGF-β2[J]. Oncol Rep, 2021, 45(1): 265-277
- [15] Wu Q, Zhang H, Yang D, et al. The m6A-induced lncRNA CASC8 promotes proliferation and chemoresistance via upregulation of hnRNPL in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(13): 4824-4836
- [16] Zhong Y, Yang L, Xiong F, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 accelerates lung cancer cells migration and invasion by interacting with SNIP1 to upregulate c-Myc [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 240
- [17] Xu J, Wu KJ, Jia QJ, et al. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(9): 673-689
- [18] Xing C, Sun SG, Yue ZQ, et al. Role of lncRNA LUCAT1 in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111158
- [19] Lv E, Sheng J, Yu C, et al. lncRNA influence sequential steps of hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 136: 111224
- [20] Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, et al. HOTAIR lncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer [J]. Clin Chim Acta, 2020, 503: 1-18
- [21] Zhang W, Guan X, Tang J. The long non-coding RNA landscape in triple-negative breast cancer[J]. Cell Prolif, 2021, 54(2): e12966
- [22] Liang Y, Song X, Li Y, et al. lncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 85
- [23] Ouyang J, Liu Z, Yuan X, et al. lncRNA PRNCR1 Promotes Breast Cancer Proliferation and Inhibits Apoptosis by Modulating microRNA-377/CCND2/MEK/MAPK Axis[J]. Arch Med Res, 2021, 52(5): 471-482
- [24] Peng PH, Chieh-Yu Lai J, Hsu KW, et al. Hypoxia-induced lncRNA RP11-390F4.3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis through upregulating EMT regulators [J]. Cancer Lett, 2020, 483: 35-45

- [11] Pidíková P, Reis R, Herichova I. MiRNA clusters with down-regulated expression in human colorectal cancer and their regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4633
- [12] 吴若霞, 李正阳, 任婷, 等. 加味丹参饮结合 miR-21 对缺血再灌注损伤心肌细胞的影响研究 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(2): 277-281
- [13] Sekar D. Implications of microRNA 21 and its involvement in the treatment of different type of arthritis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2): 941-947
- [14] Arghiani N, Matin MM. MiR-21: A key small molecule with great effects in combination cancer therapy[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2021, 31(4): 271-283
- [15] Huang S, Lin Y, Liang Z, et al. Erythropoietin helix B surface peptide modulates miR-21/Atg12 axis to alleviates cardiomyocyte hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2422-2430
- [16] Xu HX, Pan W, Qian JF, et al. MicroRNA-21 contributes to the puerarin-induced cardioprotection via suppression of apoptosis and oxidative stress in a cell model of ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(1): 719-727
- [17] Li Q, Yao Y, Shi S, et al. Inhibition of miR-21 alleviated cardiac perivascular fibrosis via repressing EndMT in T1DM [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 910-920
- [18] Zhang XY, Huang Z, Li QJ, et al. Role of HSP90 in suppressing TLR4-mediated inflammation in ischemic postconditioning [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2020, 76(1): 51-62
- [19] Zhang B, Zhang J, Ainiwaer Y, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion by inhibiting the HMGB1-TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2021, 51(3): 376-384
- [20] Pan J, Alimujiang M, Chen Q, et al. Exosomes derived from miR-146a-modified adipose-derived stem cells attenuate acute myocardial infarction-induced myocardial damage via downregulation of early growth response factor 1[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4433-4443
- [21] Wang Y, Wang L, Li JH, et al. Morphine alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8616-8624
- [22] Zhang JW, Long TY, Pan W, et al. MiR-808 inhibits cardiomyocyte apoptosis and expressions of caspase-3 and caspase-9 in rats with myocardial infarction by regulating TGF- β 1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(12): 6955-6960
- [23] Vardiyani R, Ezati D, Anvari M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax[J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2020, 47(3): 155-160
- [24] Pan YQ, Li J, Li XW, et al. Effect of miR-21/TLR4/NF- κ B pathway on myocardial apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7928-7937
- [25] Liu Z, Wang H, Hou G, et al. Notoginsenoside R1 protects oxygen and glucose deprivation-induced injury by upregulation of miR-21 in cardiomyocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9181-9192

(上接第 806 页)

- [25] Hu X, Yang L, Mo YY. Role of Pseudogenes in Tumorigenesis[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(8): 256
- [26] Pink RC, Carter DR. Pseudogenes as regulators of biological function [J]. *Essays Biochem*, 2013, 54: 103-112
- [27] Grandér D, Johnsson P. Pseudogene-Expressed RNAs: Emerging Roles in Gene Regulation and Disease [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016, 394: 111-126
- [28] Qi Y, Wang X, Li W, et al. Pseudogenes in Cardiovascular Disease [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 7: 622540
- [29] Chiefari E, Iiritano S, Paonessa F, et al. Pseudogene-mediated posttranscriptional silencing of HMGA1 can result in insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Nat Commun*, 2010, 1: 40
- [30] Ma Y, Liu S, Gao J, et al. Genome-wide analysis of pseudogenes reveals HBBP1's human-specific essentiality in erythro poiesis and implication in β -thalassemia[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(4): 478-493.e11
- [31] Moreno-García L, López-Royo T, Calvo AC, et al. Competing Endogenous RNA Networks as Biomarkers in Neurodegenerative Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9582
- [32] Feng J, Yang G, Liu Y, et al. LncRNA PCNAP1 modulates hepatitis B virus replication and enhances tumor growth of liver cancer [J]. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5227-5245
- [33] Guo X, Deng L, Deng K, et al. Pseudogene PTENP1 Suppresses Gastric Cancer Progression by Modulating PTEN [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16(4): 456-64
- [34] Li C, Zheng L, Xin Y, et al. The competing endogenous RNA network of CYP4Z1 and pseudogene CYP4Z2P exerts an anti-apoptotic function in breast cancer [J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(7): 991-1000
- [35] Chen S, Wang Y, Zhang JH, et al. Long non-coding RNA PTENP1 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells via AKT and MAPK signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4659-4662
- [36] 金优萍, 李录英, 周平. 长链非编码 RNA STMN1P2 在乳腺癌中的作用及机制研究[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(07): 596-604