

论著·基础研究

lncRNA AC092718.4对HER2阳性乳腺癌耐药性的影响及其可能机制[▲]

石雪枫¹ 余繁荣² 廖春淮¹ 卢晓婷¹ 王强¹ 卓睿¹

(1 广西中医药大学附属桂林市中医医院乳腺科, 广西桂林市 541002;

2 上海交通大学医学院附属第六人民医院南院妇产科, 上海市 201400)

【摘要】 目的 探讨长链非编码RNA(lncRNA)AC092718.4对人类表皮生长因子受体2(HER2)阳性乳腺癌耐药性的影响及其可能机制。方法 (1)获取曲妥珠单抗非耐药及耐药HER2阳性乳腺癌患者的乳腺癌组织(设为非耐药组、耐药组),检测其lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100钙结合蛋白P(S100P) mRNA和蛋白的表达水平。(2)以对曲妥珠单抗不敏感的HER2阳性乳腺癌细胞系MDA-MB-361细胞作为原发耐药细胞模型,以乳腺癌细胞株BT-474细胞为亲本,构建对曲妥珠单抗继发耐药的细胞模型(BT-474/TRA细胞)。检测3种细胞中lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P mRNA和蛋白的表达水平。经同一浓度曲妥珠单抗干预48 h后,检测3种细胞的活力。(3)取MDA-MB-361细胞分为sh-AC092718.4组、sh-NC组、对照组进行实验,其中sh-AC092718.4组细胞和sh-NC组分别转染sh-AC092718.4和sh-NC,对照组细胞未经任何处理。经同一浓度曲妥珠单抗干预48 h后,检测3组细胞的活力。(4)采用starBase和TargetScan分别预测lncRNA AC092718.4和miR-135a-5p的潜在靶标。通过双荧光素酶报告基因实验验证lncRNA AC092718.4与miR-135a-5p之间、miR-135a-5p与S100P之间的靶向结合情况。结果 (1)与非耐药组相比,耐药组lncRNA AC092718.4、S100P mRNA、S100P蛋白表达水平升高,miR-135a-5p表达水平降低($P<0.05$)。(2)与BT-474细胞相比,BT-474/TRA细胞及MDA-MB-361细胞的lncRNA AC092718.4、S100P mRNA、S100P蛋白表达水平升高,miR-135a-5p表达水平降低,曲妥珠单抗干预48 h后的细胞活力更大($P<0.05$)。(3)与对照组和sh-NC组比较,sh-AC092718.4组MDA-MB-361细胞活力降低($P<0.05$)。(4)starBase预测结果显示,lncRNA AC092718.4与miR-135a-5p有靶向结合位点;TargetScan预测结果显示,miR-135a-5p与S100P有靶向结合位点。荧光素酶报告基因实验结果提示,lncRNA AC092718.4可与miR-135a-5p直接结合,S100P是miR-135a-5p的靶基因。结论 lncRNA AC092718.4促进乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生耐药性,下调lncRNA AC092718.4表达可减轻MDA-MB-361细胞对曲妥珠单抗的耐药性,其机制可能涉及lncRNA AC092718.4作为竞争性内源RNA竞争性结合miR-135a-5p,从而上调S100P的表达。

【关键词】 乳腺癌;人类表皮生长因子受体2阳性;长链非编码RNA AC092718.4;耐药性;曲妥珠单抗;微小RNA-135a-5p;S100钙结合蛋白P

【中图分类号】 R 737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2024)01-0096-07

DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2024.01.16

Effect of lncRNA AC092718.4 on drug resistance of breast cancer in HER2 positive and its possible mechanism

SHI Xuefeng¹, YU Fanrong², LIAO Chunhui¹, LU Xiaoting¹, WANG Qiang¹, ZHUO Rui¹

(1 Department of Mammary Gland, Guilin Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangxi University of

Chinese Medicine, Guilin 541002, Guangxi, China; 2 Department of Gynecology and Obstetrics, South Branch of

Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201400, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) AC092718.4 on drug resistance of breast cancer in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive and its possible mechanism.

▲基金项目:吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6750.2020-20-33)

第一作者简介:石雪枫,本科,副主任医师,研究方向为乳腺肿瘤。

通信作者简介:卓睿,硕士,主任医师,研究方向为乳腺肿瘤。

Methods (1) Breast cancerous tissues from breast cancer patients with trastuzumab non-drug resistance and drug resistance in HER2 positive were obtained (setting as the non-drug resistance group or the drug resistance group), and their mRNA and protein expressions of lncRNA *AC092718.4*, miR-135a-5p, and S100 calcium binding protein P (S100P) were detected. (2) Regarding HER2-positive breast cancerous cell line MDA-MB-361 cells, which were insensitive to trastuzumab, as primary drug resistant cell model, and regarding breast cancerous cell strain BT-474 cells as parent, the cell model of secondary drug resistance on trastuzumab (BT-474/TRA cells) was established. The expressions of lncRNA *AC092718.4*, miR-135a-5p, and S100P mRNA and protein of the three categories of cells were detected. After 48-hour intervention of trastuzumab in the same concentration, activity of the three categories of cells was detected. (3) MDA-MB-361 cells were obtained and assigned to sh-*AC092718.4* group, sh-NC group, or control group for experiment, therein cells in the sh-*AC092718.4* group and the sh-NC group were transfected with sh-*AC092718.4* and sh-NC, respectively, whereas cells in the control group did not receive treatment. After 48-hour intervention of trastuzumab in the same concentration, activity of cells in the three groups were detected. (4) The starBase and TargetScan were used to predict potential targets of lncRNA *AC092718.4* and miR-135a-5p, respectively. The dual luciferase reporter gene experiment was used to validate the targeted binding between lncRNA *AC092718.4* and miR-135a-5p, and between miR-135a-5p and S100P. **Results** (1) Compared with the non-drug resistance group, the drug resistance group exhibited elevated expressions of lncRNA *AC092718.4*, S100P mRNA, and S100P protein, while a decreased expression of miR-135a-5p ($P<0.05$). (2) Compared with BT-474 cells, expressions of lncRNA *AC092718.4*, S100P mRNA, and S100P protein of BT-474/TRA cells and MDA-MB-361 cells were elevated, while miR-135a-5p expression was decreased, as well as cell activity of trastuzumab was greater after 48 hours of intervention ($P<0.05$). (3) Compared with the control group and the sh-NC group, the sh-*AC092718.4* group yielded decreased activity of MDA-MB-361 cells ($P<0.05$). (4) The results of starBase prediction revealed that lncRNA *AC092718.4* had targeted binding loci with miR-135a-5p; moreover, the results of TargetScan prediction indicated that there were targeted binding loci between miR-135a-5p and S100P. The results of dual luciferase reporter gene experiment interpreted that lncRNA *AC092718.4* might bind directly to miR-135a-5p, and S100P was the target gene of miR-135a-5p. **Conclusion** Breast cancerous cells developing drug resistance on trastuzumab can be promoted by lncRNA *AC092718.4*. Down-regulating lncRNA *AC092718.4* expression may relieve MDA-MB-361 cells on drug resistance of trastuzumab, and its mechanism may be involved lncRNA *AC092718.4* as a competitive endogenous RNA competitively binding miR-135a-5p, thereby up-regulating S100P expression.

【Key words】 Breast cancer, Human epidermal growth factor receptor 2 positive, Long non-coding RNA *AC092718.4*, Drug resistance, Trastuzumab, MicroRNA-135a-5p, S100 calcium binding protein P

乳腺癌是女性最常见的肿瘤,也是全球女性恶性肿瘤死亡的主要原因之一^[1]。虽然目前已通过早发现、早治疗提高乳腺癌患者的存活率,但仍有部分患者的预后不良,导致其身心健康受到威胁。研究显示,有15%~20%的乳腺癌患者肿瘤病灶组织中人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)呈高表达,此类患者肿瘤进展快,容易发生淋巴结或远处转移,预后和生存率较差^[2]。目前,包括曲妥珠单抗在内的抗HER2单克隆抗体已被用于治疗HER2阳性乳腺癌患者,其中曲妥珠单抗可靶向作用于HER2并沉默其功能,主要用于HER2阳性的早期或转移性胃癌和乳腺癌的治疗。然而,仅有一小部分HER2阳性乳腺癌患者对曲妥珠单抗反应良好,超过60%的HER2阳性患者易对曲妥珠单抗产生耐药性^[3]。因此,迫切需要探讨曲妥珠单抗的耐药机制,以寻找有效的乳腺癌分子标志物和治疗靶标。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类保守性较差的内源RNA,长度约为200个核苷酸,其不参与编码蛋白质,但参与基因表达的调控。lncRNA通过多种机制参与人体复杂的生物过程,包括通过替代剪接、海绵化miRNA和募集染色质修饰酶进行基因调控。已有研究表明部分lncRNA与乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药性有关,例如lncRNA *SNHG14*通过组蛋白H3第27位赖氨酸位点的乙酰化来调节细胞质多聚腺苷酸结合蛋白1的表达,从而诱导乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药性^[4];lncRNA *ATB*可促进乳腺癌细胞的侵袭和转移,以及对曲妥珠单抗的耐药性^[5]。有学者发现,lncRNA *AC092718.4*在对曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞中呈高表达^[6],但lncRNA *AC092718.4*在曲妥珠单抗耐药乳腺癌中的作用未见报告。因此,

本研究探讨 lncRNA AC092718.4 对 HER 阳性乳腺癌细胞曲妥珠单抗耐药性的影响及其机制,为阐明临床上曲妥珠单抗耐药的产生机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 胎牛血清(Gibco 公司,批号:10099141),高糖 DMEM(Gibco 公司,批号:11995065),无血清 Opti-MEM(Gibco 公司,批号:31985070),曲妥珠单抗(江西瑞威尔生物科技有限公司,批号:180288-69-1),Lipfectamine 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司,批号:11668027),TRIzol™ Reagent 试剂(Invitrogen 公司,批号:15596026),反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix(TaKaRa 公司:RR036A),SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa 公司,批号:RR036A),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:P0013B),二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号:E112-01),PVDF 膜(Millipore® 公司,批号:GVWP02500),兔抗人 S100 钙结合蛋白 P(S100 calcium binding protein P, S100P) 抗体(Cell Signaling Technology, Inc.,批号:7677S),兔抗人 GAPDH 抗体(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:5174T),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(北京康为维世纪生物科技股份有限公司,批号:CW0102),CKK-8 试剂盒(Dojindo Molecular Technologies, Inc.,批号:CK04),pGL3 载体(Promega 公司,批号:E1751),定点诱变试剂盒(Stratagene 公司,批号:200521),miR-135a-5p mimic 或 miR-135a-5p 阴性对照物(上海吉玛制药技术有限公司构建),干扰质粒 sh-AC092718.4 和对照质粒 sh-NC(上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建)。多功能酶标仪(BioTek 公司,型号:Synergy2),实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific 公司,型号:7500),化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司,型号:Tanon 5200),双荧光素酶测定系统(Promega 公司,型号:3010C)

1.2 组织标本来源 纳入 2018 年 5 月至 2020 年 5 月在广西中医药大学附属桂林市中医医院初次确诊 HER2 阳性乳腺癌患者且经曲妥珠单抗规范治疗后达到缓解或部分缓解的患者(非耐药组)、曲妥珠单抗耐药^[7]的 HER2 阳性乳腺癌患者(耐药组)各 30 例,收集所有患者的乳腺癌组织。纳入标准:经病理检查确诊为乳腺癌,且免疫组织化学检测提示 HER2 为+++ ,或者免疫组织化学检测提示 HER2 为++ ,经荧光原位杂交检测证实为+++^[6]。排除标准:放弃靶向治疗,或者在

中途更换靶向药物的患者。用生理盐水清洗收集到的组织后,立即将其冻存于液氮用于后续实验。本研究经广西中医药大学附属桂林市中医医院医学伦理委员会批准,所有患者均已签署知情同意书。

1.3 细胞培养 人乳腺癌细胞系 BT-474 细胞对曲妥珠单抗不敏感的 HER-2 阳性人乳腺癌细胞系 MDA-MB-361 细胞和人肾上皮细胞系 293T 细胞均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,均用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的高糖 DMEM,置于 37 °C、5% CO₂ 和 95% 湿度的恒温培养箱中培养,取对数期细胞进行后续实验。细胞实验每组设置 3 个复孔。

1.4 曲妥珠单抗耐药乳腺癌细胞株的建立 以对曲妥珠单抗不敏感的 HER2 阳性乳腺癌细胞系 MDA-MB-361 细胞作为原发耐药的细胞模型,以乳腺癌细胞株 BT-474 细胞为亲本,参考宋礼华等^[8]的方法构建对曲妥珠单抗耐药的 BT-474 细胞(BT-474/TRA 细胞),作为继发耐药细胞模型。取对数生长期的 BT-474 细胞,加入 10 μg/mL 浓度的曲妥珠单抗进行培养,每 2~3 d 换液 1 次,待到细胞生长密度达 80%~90% 时进行传代,然后依次提高曲妥珠单抗的浓度至 20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 进行细胞培养,每隔 4 周调整 1 次浓度。持续培养 3 个月后,在 100 μg/mL 浓度条件下能稳定生长、传代的细胞即为 BT-474/TRA 细胞。

1.5 细胞转染 取对数生长期 MDA-MB-361 细胞,接种于 6 孔板(2×10⁵ 个/孔),使用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养 24 h 后,分为 sh-AC092718.4 组、sh-NC 组、对照组进行实验,其中 sh-AC092718.4 组和 sh-NC 组细胞分别转染 sh-AC092718.4 和 sh-NC,对照组细胞未经任何处理。转染过程均在超净台中进行,按照 Lipfectamine 2000 转染试剂盒说明书的操作步骤,使用无血清 Opti-MEM 分别稀释相应质粒、Lipfectamine 2000,然后将两者轻轻混匀,室温条件下孵育 5 min 后再次将两管液体轻轻混匀,静置 20 min。在此期间可将待转染细胞培养基更换为含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM,20 min 后将上述的转染混合液加入到待转染细胞的培养基中,孵育 8 h 后更换含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的高糖 DMEM。转染 48 h 后通过实时荧光定量 PCR 检测 lncRNA AC092718.4 表达情况以评估转染情况,然后再进行后续实验。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 使用 TRIzol™ Reagent 试剂提取乳腺癌组织、BT-474 细胞、BT-474/TRA 细胞、MDA-MB-361 细胞,以及 1.5 中 3 组 MDA-MB-361 细胞的总 RNA,并用多功能酶标仪检测 RNA 浓度及纯度。

取RNA 500 ng,使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix将RNA反转录合成cDNA,随后进行实时荧光定量PCR反应。根据SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒说明书配置的PCR反应体系(共20 μL),包括2×Premix Ex Taq (Probe qPCR) 10 μL、上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL、下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL、荧光探针溶液0.8 μL、ROX Reference Dye (1×) 0.4 μL、cDNA模板2 μL、ddH₂O 6 μL。PCR反应步骤:预变性95 °C 2 min;变性95 °C 30 s,退火60 °C 30 s 72 °C 1 min,循环40次。以GAPDH或U6作为管家基因对目的基因表达进行标准化,采用2^{-ΔΔCt}法分析目的基因的相对表达水平。各基因扩增引物序列见表1。实验重复3次。

表1 基因引物序列

基因	引物序列
lncRNA AC092718.4	上游:5'-GTCCGCAAATGACCCGTA-3'
	下游:5'-CCCACCCACTCTCTGACCCG-3'
miR-135a-5p	上游:5'-AACCTGCTCGCAGTATTTGAG-3'
	下游:5'-CGCGCAGTATGGCTTTTTATTCC-3'
U6	上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'
	下游:5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTCT-3'
S100P	上游:5'-GGATGGATTGGATGACTCCTTG-3'
	下游:5'-CCCAGGCTGTACGATGAATTT-3'
GAPDH	上游:5'-GTCCATGGTCTGCTAGCATCGAT-3'
	下游:5'-TGCTAGCTGGCATGCCGATCGATC-3'

1.7 Western blot 检测 取乳腺癌组织、BT-474细胞、BT-474/TRA细胞、MDA-MB-361细胞,以及1.5中3组MDA-MB-361细胞,采用含1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取总蛋白,采用二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒检测各样品中的蛋白浓度。沸水煮5 min进行蛋白变性后,通过10%SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭PVDF膜1 h后,分别加入一抗兔抗人S100P抗体、兔抗人GAPDH抗体(稀释比例为1:1 000),4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次(5 min/次)后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(稀释比例为1:5 000)室温孵育1 h, TBST洗膜3次(5 min/次)。以GAPDH作为内参蛋白,采用化学发光成像系统进行可视化和数据分析。实验重复3次。

1.8 CCK-8检测 取BT-474细胞、BT-474/TRA细胞、转染前MDA-MB-361细胞,以及1.5中3组MDA-MB-361细胞接种于96孔板(5×10³个/孔),用10 μg/mL曲妥珠单抗(10 μL/孔)孵育。48 h后,按照CCK-8试剂盒说明书进行操作,在每孔中加入CCK-8试剂孵育2 h。同时设置对照孔(含未处理的细胞及CCK-8试剂)和空白孔(仅含CCK-8试剂和培养基)。采用多功能酶

标仪测定各孔450 nm波长处的吸光度值。计算细胞活力,细胞活力(%)=(实验孔吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照孔吸光度值-空白孔吸光度值)×100%。实验重复3次。

1.9 双荧光素酶报告基因实验 采用starBase (https://rnasysu.com/encori/index.php)和TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_72/)分别预测lncRNA AC092718.4和miR-135a-5p的潜在靶标。根据预测结果,分别设计lncRNA AC092718.4和S100P的突变序列和野生序列,并进行克隆,插入pGL3载体以产生野生型lncRNA AC092718.4报告基因(lncRNA AC092718.4-Wt)和野生型S100P报告基因(S100P-Wt)。使用定点诱变试剂盒合成突变型lncRNA AC092718.4报告基因(lncRNA AC092718.4-Mut)和突变型S100P报告基因(S100P-Mut)。根据Lipfectamine 2000转染试剂盒说明书的操作步骤,将用miR-135a-5p模拟物(miR-135a-5p mimic组)、miR-135a-5p阴性对照物(miR-135a-5p NC组)分别与上述4个报告基因共转染293T细胞。48 h后采用双荧光素酶测定系统检测荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性作为标准化对照。实验重复3次。

1.10 统计学分析 采用R语言软件(版本3.6.1)进行统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用配对t检验、两独立样本t检验或单因素方差分析。以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者乳腺癌组织中lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P表达水平的比较 与非耐药组相比,耐药组乳腺癌组织中的lncRNA AC092718.4、S100P mRNA、S100P蛋白表达水平升高,miR-135a-5p表达水平降低(P < 0.05),见表2。

表2 两组患者乳腺癌组织中lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	lncRNA AC092718.4	miR-135a-5p	S100P mRNA	S100P蛋白
非耐药组	30	0.98±0.13	1.01±0.15	1.02±0.13	0.78±0.11
耐药组	30	1.84±0.16	0.38±0.09	1.92±0.19	1.12±0.10
t值		22.178	25.133	19.407	23.421
P值		0.004	0.008	0.007	0.006

2.2 BT-474细胞、BT-474/TRA细胞、MDA-MB-361细胞中lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P表达水平的比较 与BT-474细胞相比,BT-474/TRA细胞及MDA-MB-361细胞的lncRNA AC092718.4、S100P mRNA、S100P蛋白表达水平升高,miR-135a-5p表达水平降低(P < 0.05),且MDA-MB-361细胞的lncRNA AC092718.4表达水平高于BT-474/TRA细胞(P < 0.05),见表3及图1。

表3 3种细胞中lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P相对表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

细胞	n	lncRNA AC092718.4	miR-135a-5p	S100P mRNA	S100P 蛋白
BT-474 细胞	3	1.02±0.13	1.01±0.12	0.99±0.11	0.47±0.05
BT-474/TRA 细胞	3	2.25±0.18*	0.31±0.07*	2.37±0.21*	0.95±0.10*
MDA-MB-361 细胞	3	2.73±0.25**	0.28±0.08*	2.44±0.18*	1.03±0.11*
F 值		95.235	47.100	52.218	109.258
P 值		0.004	0.005	0.009	0.009

注:与BT-474细胞比较,* P<0.05;与BT-474/TRA 细胞比较,# P<0.05。

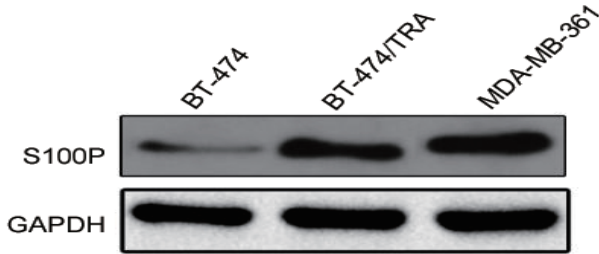


图1 3种细胞的S100P蛋白表达情况

2.3 曲妥珠单抗处理干预后BT-474细胞、BT-474/TRA细胞、MDA-MB-361细胞的活力比较 经同一浓度曲妥珠单抗干预48 h后,BT-474/TRA细胞和MDA-MB-361细胞的活力大于BT-474细胞,且MDA-MB-361细胞的活力大于BT-474/TRA细胞(P<0.05),见表4。

表4 3种细胞活力的比较($\bar{x}\pm s, %$)

细胞	n	细胞活力
BT-474 细胞	3	27.57±1.66
BT-474/TRA 细胞	3	77.24±5.32*
MDA-MB-361 细胞	3	88.22±6.07**
F 值		432.183
P 值		0.008

注:与BT-474细胞比较,* P<0.05;与BT-474/TRA细胞比较,# P<0.05。

2.4 lncRNA AC092718.4表达下调对MDA-MB-361细胞活力的影响 实时荧光定量PCR检测结果显示,sh-AC092718.4组MDA-MB-361细胞中lncRNA AC092718.4的表达水平低于对照组和sh-NC组(P<0.05),而对照组与sh-NC组的lncRNA AC092718.4表达水平差异无统计学意义(P>0.05),证明基因敲除成功,见表5。CCK-8检测结果显示,与对照组和sh-NC组比较,sh-AC092718.4组MDA-MB-361细胞活力降低(P<0.05),而对照组与sh-NC组MDA-MB-361细胞活力差异无统计学意义(P>0.05),见表6。

表5 3组MDA-MB-361细胞lncRNA AC092718.4相对表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	lncRNA AC092718.4
对照组	3	0.99±0.11
sh-NC 组	3	1.02±0.10
sh-AC092718.4 组	3	0.19±0.04**
F 值		78.149
P 值		0.007

注:与对照组相比,* P<0.05;与sh-NC组相比,# P<0.05。

表6 3组MDA-MB-361细胞活力的比较($\bar{x}\pm s, %$)

组别	n	细胞活力
对照组	3	92.18±6.25
sh-NC 组	3	95.36±5.47
sh-AC092718.4 组	3	30.05±4.19**
F 值		33.416
P 值		0.005

注:与对照组和sh-NC组相比,* P<0.05;与sh-NC组相比,# P<0.05。

2.5 潜在靶点预测结果及双荧光素酶报告基因实验结果 starBase 预测结果显示,lncRNA AC092718.4与miR-135a-5p有靶向结合位点,TargetScan 预测结果显示,miR-135a-5p与S100P有靶向结合位点,见图2。荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-135a-5p mimic组与miR-135a-5p NC组的lncRNA AC092718.4-Mut 荧光素酶活性、S100P-Mut 荧光素酶活性差异无统计学意义(P>0.05),而miR-135a-5p mimic组的lncRNA AC092718.4-Wt 荧光素酶活性、S100P-Wt 荧光素酶活性低于miR-135a-5p NC组(P<0.05),见表7、表8。上述结果表明,lncRNA AC092718.4可与miR-135a-5p直接结合,S100P是miR-135a-5p的靶基因。

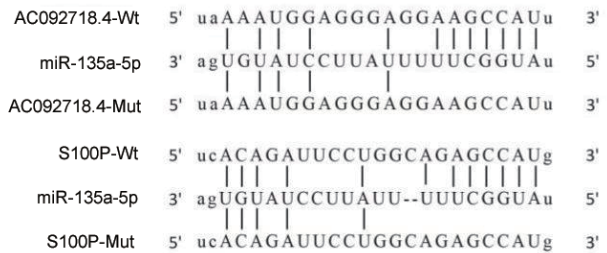


图2 数据库预测结果及双荧光素酶突变位点

表7 两组293T细胞的lncRNA AC092718.4-Mut及lncRNA AC092718.4-Wt 荧光素酶活性($\bar{x}\pm s$)

组别	n	lncRNA AC092718.4-Mut 荧光素酶活性	lncRNA AC092718.4-Wt 荧光素酶活性
miR-135a-5p NC 组	3	0.99±0.13	1.03±0.11
miR-135a-5p mimic 组	3	1.01±0.08	0.36±0.06
t 值		3.988	19.057
P 值		0.380	0.008

表8 两组293T细胞的*S100P-Mut*及*S100P-Wt*荧光素酶活性($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>S100P-Mut</i> 荧光素酶活性	<i>S100P-Wt</i> 荧光素酶活性
miR-135a-5p NC组	3	0.98 ± 0.14	1.02 ± 0.10
miR-135a-5p mimic组	3	1.00 ± 0.12	0.30 ± 0.07
<i>t</i> 值		3.421	23.182
<i>P</i> 值		0.218	0.007

3 讨论

人类基因组测序表明,只有2%的人类基因编码蛋白质,转录为RNA而不能编码蛋白质的基因被称为非编码RNA^[9]。非编码RNA在表观遗传学、转录和转录后翻译过程中具有重要作用^[10],其可通过多种机制调节肿瘤细胞增殖、凋亡、转移,以及上皮-间质转化和血管生成。已有多项研究报告了在乳腺癌中lncRNA与曲妥珠单抗抗性之间的关系。例如lncRNA *AFAP1-AS1* 靶向作用于AU碱基富集区RNA结合因子1并激活*ERBB2*的翻译,导致乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生耐药性^[11]。lncRNA *AGAP2-AS1* 通过上调*MyD88*的表达来抑制乳腺癌细胞凋亡并促进曲妥珠单抗抗性^[12]。本研究分析了lncRNA *AC092718.4* 与HER2阳性乳腺癌耐药的关系,结果显示lncRNA *AC092718.4* 在曲妥珠单抗耐药的HER2阳性乳腺癌组织、曲妥珠单抗原发耐药和继发耐药的HER2阳性乳腺癌细胞中均高表达,提示lncRNA *AC092718.4* 可能在HER2阳性乳腺癌对曲妥珠单抗产生耐药性的过程中发挥一定的作用。此外,无论是曲妥珠单抗原发耐药还是继发耐药的HER2阳性乳腺癌细胞,曲妥珠单抗干预后细胞活力仍大于非耐药乳腺癌细胞;进一步敲低曲妥珠单抗原发耐药的HER2阳性乳腺癌细胞系MDA-MB-361细胞中的lncRNA *AC092718.4* 后再给予曲妥珠单抗进行干预,细胞活力下降,即下调lncRNA *AC092718.4* 表达可减轻MDA-MB-361细胞对曲妥珠单抗的耐药性,表明在HER2阳性乳腺癌中lncRNA *AC092718.4* 对曲妥珠单抗抗性的产生具有一定的调控作用。

lncRNA可通过多种机制调节肿瘤细胞耐药性,充当特定miRNA的内源竞争RNA,通过改变靶基因

的表达,从而调节肿瘤细胞耐药,这是lncRNA的功能之一。miRNA募集RNA诱导的沉默复合物并与靶基因结合以抑制翻译,而lncRNA可与miRNA竞争性结合并抑制其沉默效应,充当“分子海绵”^[13]。内源竞争RNA在与肿瘤相关的许多生物过程中发挥着重要作用。研究表明,lncRNA *TMPO-AS1* 与miR-1179竞争性结合,上调*TRIM37*的表达,从而增强乳腺癌的化疗耐药性和侵袭能力^[14]。本研究中,生物信息学预测结果提示lncRNA *AC092718.4* 与miR-135a-5p存在结合位点,miR-135a-5p可以与*S100P*靶向结合,并通过荧光素酶报告基因实验进一步证实了上述预测结果。故本研究进一步分析了miR-135a-5p与*S100P*在HER2阳性乳腺癌中的表达情况。

miR-135a-5p在多种肿瘤中表达下调,并对肿瘤的发生、发展发挥重要作用。研究表明,miR-135a-5p前体miR-135a的低表达与胃癌的总体存活率降低相关^[15]。此外,miR-135a还可通过靶向调节*STAT6*的表达来诱导前列腺癌细胞凋亡^[16]。在本研究中,miR-135a-5p在曲妥珠单抗耐药的HER2阳性乳腺癌组织、曲妥珠单抗原发耐药和继发耐药的HER2阳性乳腺癌细胞中均低表达。这提示miR-135a-5p可能参与调控HER2阳性乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药性,但其具体作用机制,以及lncRNA *AC092718.4* 对HER2阳性乳腺癌耐药性的影响是否与miR-135a-5p相关,仍需进一步研究。

*S100P*属于*S100*家族,主要参与调节钙稳态、细胞增殖和凋亡、细胞侵袭和运动、肿瘤细胞转移、血管生成、细胞骨架相互作用、蛋白质磷酸化、转录因子的调节、自身免疫、趋化性和炎症等^[17]。*S100P*在三阴性乳腺癌中高表达,并与三阴性乳腺癌患者的不良预后相关^[18]。Cong等^[19]发现,*S100P*通过调节核因子κB、细胞周期素D1、上皮型钙黏蛋白和波形蛋白来增强乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。Merry等^[20]的研究表明,*S100P*通过激活RAS/MEK/MAPK信号通路以减弱曲妥珠单抗对HER2的抑制作用,从而促进乳腺癌细胞对曲妥珠单抗产生耐药性。本研究结果表明,*S100P*在曲妥珠单抗耐药的HER2阳性乳腺癌组织、曲妥珠单抗原发耐药和继发耐药的HER2阳性乳腺癌细胞中均高表达,这与上述研究结

果相符。这提示 S100P 也可能参与调控 HER2 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药性。本研究荧光素酶报告基因实验结果表明 miR-135a-5p 可以与 S100P 靶向结合,但 lncRNA AC092718.4、miR-135a-5p、S100P 三者的关系及其与 HER2 阳性乳腺癌耐药性的相关性仍需进一步研究。

综上所述,lncRNA AC092718.4 在曲妥珠单抗耐药的 HER2 阳性乳腺癌组织和细胞中高表达,下调 lncRNA AC092718.4 表达可减轻 MDA-MB-361 细胞对曲妥珠单抗的耐药性,其机制可能涉及 lncRNA AC092718.4 作为竞争性内源 RNA 竞争性结合 miR-135a-5p,从而上调 S100P 的表达进而促进 HER2 阳性乳腺癌细胞产生耐药性。本研究结论或许可为研究 HER2 阳性乳腺癌的耐药机制,以及 HER2 阳性乳腺癌的临床治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Liu H, Shi WJ, Jin Z, et al. Global, regional, and national mortality trends of female breast cancer by risk factor, 1990–2017[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1):459.
- [2] Li N, Deng YJ, Zhou LH, et al. Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 195 countries and territories, from 1990 to 2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):140.
- [3] Amadori D, Milandri C, Comella G, et al. A phase I/II trial of non-pegylated liposomal doxorubicin, docetaxel and trastuzumab as first-line treatment in HER-2-positive locally advanced or metastatic breast cancer[J]. Eur J Cancer (1965), 2011, 47(14):2091–2098.
- [4] Dong HY, Wang W, Mo SW, et al. Long non-coding RNA SNHG14 induces trastuzumab resistance of breast cancer via regulating PABPC1 expression through H3K27 acetylation[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(10):4935–4947.
- [5] Shi SJ, Wang LJ, Yu B, et al. LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(13):11652–11663.
- [6] Gale M, Li Y, Cao J, et al. Acquired resistance to HER2-targeted therapies creates vulnerability to ATP synthase inhibition[J]. Cancer Res, 2020, 80(3):524–535.
- [7] 邢一舒,王赛琪,吕慧芳,等.曲妥珠单抗耐药机制研究进展[J].国际临床研究杂志,2022,6(2):19–24.
- [8] 宋礼华,胡思怡,张志辉.曲妥珠单抗耐药的人乳腺癌细胞株及其制备方法和应用:CN201510187748.1[P]. 2015-07-08.
- [9] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. Science, 2007, 316(5830):1484–1488.
- [10] Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones[J]. Cell, 2014, 157(1):77–94.
- [11] Han ML, Gu YT, Lu PW, et al. Exosome-mediated lncRNA AFAP1-AS1 promotes trastuzumab resistance through binding with AUF1 and activating ERBB2 translation[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1):26.
- [12] Dong HY, Wang W, Mo SW, et al. SP1-induced lncRNA AGAP2-AS1 expression promotes chemoresistance of breast cancer by epigenetic regulation of MyD88[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):202.
- [13] Wen JT, Liu J, Wan L, et al. Long noncoding RNA/circular RNA regulates competitive endogenous RNA networks in rheumatoid arthritis: molecular mechanisms and traditional Chinese medicine therapeutic significances[J]. Ann Med, 2023, 55(1):973–989.
- [14] Ning XJ, Zhao JG, He F, et al. Long non-coding RNA TMPO-AS1 facilitates chemoresistance and invasion in breast cancer by modulating the miR-1179/TRIM37 axis[J]. Oncol Lett, 2021, 22(1):500.
- [15] Xie Y, Li F, Li Z, et al. miR-135a suppresses migration of gastric cancer cells by targeting TRAF5-mediated NF- κ B activation[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:975–984.
- [16] Xu B, Lu XM, Zhao YM, et al. MicroRNA-135a induces prostate cancer cell apoptosis via inhibition of STAT6[J]. Oncol Lett, 2019, 17(2):1889–1895.
- [17] Arumugam T, Logsdon CD. S100P: a novel therapeutic target for cancer[J]. Amino Acids, 2011, 41(4):893–899.
- [18] Kikuchi K, McNamara KM, Miki Y, et al. S100P and ezrin promote trans-endothelial migration of triple negative breast cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2019, 42(1):67–80.
- [19] Cong Y, Cui Y, Wang S, et al. Calcium-binding protein S100P promotes tumor progression but enhances chemosensitivity in breast cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10:566302.
- [20] Merry CR, McMahon S, Forrest ME, et al. Transcriptome-wide identification of mRNAs and lincRNAs associated with trastuzumab-resistance in HER2-positive breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(33):53230–53244.

(收稿日期:2023-10-14 修回日期:2023-12-28)