

# LncRNA *GATA3-AS1* 促进乳腺癌细胞的增殖迁移及其机制



江 琪<sup>1</sup>, 习一清<sup>2</sup>, 魏 蕾<sup>1</sup>

1. 武汉大学基础医学院病理生理学教研室 (武汉 430071)

2. 武汉大学中南医院甲乳外科 (武汉 430071)

**【摘要】目的** 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 与多种肿瘤的发生发展密切相关。本研究旨在探讨 LncRNA *GATA3-AS1* 在乳腺癌进展中的生物学作用及其机制。**方法** 使用 starBase 等在线数据库预测 *GATA3-AS1* 的下游靶基因 *GATA3*, 采用 qRT-PCR 技术检测正常乳腺细胞与乳腺癌细胞中 LncRNA *GATA3-AS1* 的表达水平, 通过在线数据库预测其表达与乳腺癌不同临床病理特征的关系。利用质粒转染实验获得低表达 *GATA3-AS1* 的细胞株, 使用 Cell Counting Kit-8 (CCK8) 实验、划痕实验、Transwell 实验评估 *GATA3-AS1* 在乳腺癌进展中的功能, 并采用蛋白印迹实验验证 *GATA3-AS1* 和 *GATA3* 的表达相关性。**结果** *GATA3-AS1* 在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 中显著高表达, 通过 bc-GenExMiner 数据库在线分析, *GATA3-AS1* 在年龄 > 51 岁、人类表皮生长因子受体 2 阴性 (HER2-)、雌激素受体阳性 (ER+)、孕激素受体阳性 (PR+)、激素受体 A 阳性型 (luminal A) 的乳腺癌患者中表达量更高, 且 *GATA3-AS1* 的表达与乳腺癌的总生存期呈显著负相关。体外实验表明, 沉默 *GATA3-AS1* 可显著降低乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖迁移能力。此外, 在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞系中敲低 *GATA3-AS1* 后, *GATA3* 蛋白水平显著升高, 提示 *GATA3-AS1* 的促癌作用可能是通过其蛋白编码基因 *GATA3* 的表达来介导。**结论** LncRNA *GATA3-AS1* 可能通过调节 *GATA3* 的表达促进乳腺癌肿瘤细胞的增殖与迁移。

**【关键词】** 长链非编码 RNA; *GATA3-AS1*; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 调控机制

LncRNA *GATA3-AS1* promotes the proliferation and migration of breast cancer cells and the mechanisms underlying its action

Qi JIANG<sup>1</sup>, Yi-Qing XI<sup>2</sup>, Lei WEI<sup>1</sup>

1. Department of Pathophysiology, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan 430071, China

2. Department of Breast and Thyroid Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Lei WEI, Email: leiwei@whu.edu.cn

**【Abstract】Objective** Long non-coding RNA (LncRNA) is closely related to the occurrence and development of various tumors. This study aimed to investigate the biological

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202202018

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81772823)

通信作者: 魏蕾, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: leiwei@whu.edu.cn

<http://www.jnewmed.com>

role and mechanism of lncRNA *GATA3-AS1* in breast cancer progression. **Methods** The expression level of lncRNA *GATA3-AS1* in normal and breast cancer cells was detected via qRT-PCR, and the relationship between the expression of *GATA3-AS1* and the different clinicopathological features of breast cancer was predicted using the bc-GenExMiner database. Subsequently we used the plasmid transfection experiment to obtain a breast cancer cell line with low expression of *GATA3-AS1* and evaluated the function of *GATA3-AS1* in the progression of breast cancer using Cell Counting Kit-8 (CCK8), Wound Healing, and Transwell experiments. Finally, the downstream target gene *GATA3* of *GATA3-AS1* was predicted by online databases (such as starBase), and the correlation between the proteins expressed by *GATA3-AS1* and its protein encoding gene *GATA3* was verified by Western blot assay. **Results** *GATA3-AS1* was significantly overexpressed in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and McF-7. Online analysis using the BC-GenexMINER database showed that the expression of *GATA3-AS1* was higher in breast cancer patients who were: older than 51 years, human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-), estrogen receptor-positive (ER+), progesterone receptor-positive (PR+), and hormone receptor A positive (Luminal A). *GATA3-AS1* expression was also significantly negatively correlated with the overall survival of patients with breast cancer. In vitro experiments showed that silencing *GATA3-AS1* significantly reduced the proliferation and migration of breast cancer cell lines MDA-MB-231 and McF-7. Besides, *GATA3* protein level was significantly increased after knocking down *GATA3-AS1* in MDA-MB-231 and McF-7 cell lines, suggesting that the oncogenic effect of *GATA3-AS1* may be mediated by the expression of its protein-coding gene *GATA3*. **Conclusion** lncRNA *GATA3-AS1* may promote the proliferation and migration of breast cancer cells by regulating the expression of *GATA3*.

**【Keywords】** lncRNA; *GATA3-AS1*; Breast cancer; Proliferation; Migration; Regulatory mechanism

乳腺癌 (breast cancer) 是女性最常见的恶性肿瘤之一, 据 2020 年全球癌症统计报告显示, 乳腺癌新发病例数已超肺癌, 位居女性癌症发病人数的首位<sup>[1]</sup>。2020 年, 我国女性乳腺癌的发病率和死亡例数分别位列第一及第四位, 严重威胁女性健康<sup>[2]</sup>。近几十年来, 尽管包括手术切除、化疗、靶向治疗等在内的综合治疗手段有效改善了乳腺癌患者的预后, 但局部进展及合并远处转移乳腺癌患者的中位生存期仍然较短 (约 24 个月)<sup>[3]</sup>, 因此加强对乳腺癌新型生物标志物和治疗靶点的深入探索具有重要的意义。

lncRNA 是一类超过 200 个碱基, 且几乎无法编码蛋白质的 RNA<sup>[4]</sup>。lncRNA 涉及多种生物事件, 并可参与癌症的发生和进展, 是敏感和特定的癌症生物标志物之一<sup>[5-8]</sup>。根据邻近编码基因的染色体区域, 可将 lncRNA 分为正义 lncRNA、反义 lncRNA、双向 lncRNA、内含子 lncRNA 和基因间 lncRNA 五类<sup>[9]</sup>。研究表

明, 越来越多的反义 lncRNA 在肿瘤中起调控细胞增殖、迁移和侵袭的作用<sup>[10]</sup>。例如, lncRNA *FEZF1-AS1* 通过靶向 *miR-30a/Nanog* 轴促进乳腺癌肿瘤的发生<sup>[11]</sup>; lncRNA *PCNA-AS1* 在肝癌中促进细胞增殖<sup>[12]</sup>; lncRNA *AFAP1-AS1* 在非小细胞肺癌中促进细胞迁移<sup>[13]</sup>等。

lncRNA *GATA3-AS1* 是一种新型反义 lncRNA, 与 T 细胞发育和分化有关<sup>[14]</sup>。*GATA3-AS1* 已被证实可促进肝癌细胞的细胞增殖和迁移<sup>[15]</sup>, 但在乳腺癌中的作用及其机制报道较少, 因此本文拟研究 *GATA3-AS1* 在乳腺癌中的生物作用并对其分子机制进行初步探索, 为乳腺癌新型生物标志物与药物靶点的探索提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 生物信息学分析

通过 UALCAN 在线数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 和 bc-GenExMiner 在线

数据库 (<http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-requete.php>) 分析多种肿瘤组织和乳腺癌中 *GATA3-ASI* 与 *GATA3* 的表达情况, 以及不同临床和病理参数乳腺癌患者中 *GATA3-ASI* 与 *GATA3* 的表达差异。运用 lncAtlas 在线数据库 (<https://lncatlas.crg.eu/>) 预测 *GATA3-ASI* 的细胞定位, 并通过 starBase 数据库 (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) 在线预测 *GATA3-ASI* 与 *GATA3* 的表达相关性。*GATA3-ASI* 与 *GATA3* 的生存分析由 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=breast>) 中提供的乳腺癌数据分析获得。以上结果均认为  $P < 0.05$  时, 差异有统计学意义。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养

人乳腺上皮细胞 MDA-MB-10A 和两种乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、MCF-7) 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。MDA-MB-10A 细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱中培养; MCF-7、MDA-MB-231 细胞均在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养, 其中添加 1% 的青霉素和链霉素。

### 1.2.2 质粒转染

特异性 shRNA 和 NC-shRNA 购于 GenePharma 公司, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂 (Invitrogen, 美国) 对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的 lncRNA *GATA3-ASI* 进行沉默。

### 1.2.3 CCK8 实验

将细胞按照每孔  $2 \times 10^3$  个的密度接种于 96 孔板, 使用含 10% 血清培养基培养 24 h、48 h、72 h、96 h 后, 每孔中加入 10 μL 的 CCK8 试剂 (北京庄盟生物), 37℃ 孵育 2 h 后, 使用酶标仪检测各组细胞 450 nm 处的吸光度值。

### 1.2.4 划痕实验

将细胞  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中, 当细胞达到 80%~90% 密度时, 使用黄色移液器直线刮擦细胞, PBS 洗涤划痕处两次除去漂浮细胞, 于 0 h 拍摄划痕宽度, 在含 5% 血清培养基中持续孵育 48 h 后, 再次拍摄并计算划痕宽度及伤口愈合率。

### 1.2.5 Transwell 实验

将细胞用无血清培养基重悬, 加入 transwell 小室 (康宁公司) 的上腔室, 并在 transwell 下腔

室中加入 600 μL 含 1% 双抗和 10% 胎牛血清的培养基。细胞培养 24 h 后固定细胞, 并用 0.5% 结晶紫染色, 擦去上腔室内部细胞后, 在显微镜下计数下腔表面的细胞数。

### 1.2.6 实时定量 PCR

采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 从细胞中提取总 RNA, 通过观察琼脂糖凝胶电泳中 28S 条带与 18S 条带的比值检测 RNA 的纯度和完整性; 使用逆转录试剂盒 (Thermo, 美国) 将 1 μg RNA 逆转录合成 cDNA, 在 CFX96 real-time PCR 系统上进行 qRT-PCR 程序; 使用 10 μL SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Bio-Red, 美国)、200 nM 正向和反向引物、100 ng cDNA 模板, 用双蒸馏水使最终反应体系为 20 μL。PCR 条件设置为: 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 50 个周期。目的基因表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法测定, 并以 GAPDH 为内参, 每个实验进行 3 个重复。其中引物订购于武汉擎科生物公司。

GATA3-ASI (forward): 5'-GATGGGGCTGAGAGCTTAAT-3';

GATA3-ASI (reverse): 5'-AGAGTTTCCGGTGAATGTT-3';

GATA3 (forward): 5'-TCCTCTCTGCTCTTCGCTAC-3';

GATA3 (reverse): 5'-ACGGGACCAGGTTGTAATAA-3';

GAPDH (forward): 5'-AATGGACAACCTGGTCTGGAC-3';

GAPDH (reverse): 5'-CCCTCCAGGGGATC-TGTTTG-3'.

### 1.2.7 核质分离

使用 Ambion PARIS™ (Thermo) 试剂盒, 按照说明书内容从细胞中分离细胞质和核 RNA, 并进行纯化。使用 qRT-PCR 检测 *GATA3-ASI* 的表达水平。

### 1.2.8 蛋白印迹实验

首先, 使用增强的 RIPA 裂解缓冲液 (北京索拉博) 从细胞中提取总蛋白, 用 BCA 蛋白测定试剂盒 (上海翊圣生物) 对提取的蛋白进行定量; 其次, 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 采用湿转移法将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上; 再次, 使用 5% 脱脂牛奶对膜进行封闭处理, 且敷育相应的抗体; 最后经 TBST 冲洗后, 用显像液显像。

## 1.3 统计学分析

本研究各项实验均重复三次, 研究数据以平均数和标准差表示, 使用  $t$  检验和方差分析比较各组数据之间的差异, 当  $P < 0.05$  时表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *GATA3-AS1*在乳腺癌中的表达量与预后相关

通过UALCAN在线数据库对*GATA3-AS1*进行表达分析,发现*GATA3-AS1*在多种肿瘤组织中存在差异表达(图1-A),且相较正常乳腺组织,*GATA3-AS1*在乳腺癌组织中的表达明显升高(图1-B)。根据数据库提供的两个*GATA3-AS1*探针(240192\_at和240827\_at),Kaplan-Meier生存曲线提示*GATA3-AS1*表达与乳腺癌总生存期显著负相关,即高表达*GATA3-AS1*的乳腺癌患者预后较差(图1-C)。

利用bc-GenExMiner在线数据库分析不同临床和病理参数乳腺癌患者中*GATA3-AS1*的表达差异,发现*GATA3-AS1*的表达与乳腺癌患者年龄之间存在显著相关性,年龄 $\leq 51$ 岁的患者*GATA3-AS1*表达水平明显低于年龄 $>$

51岁的患者(图2-A)。同时,*GATA3-AS1*的表达与Scarff-Bloom-Richardson(SBR)等级(图2-B)以及*P53*基因突变(图2-C)也存在显著相关性。此外,*GATA3-AS1*在人类表皮生长因子受体2阴性(HER2-)、雌激素受体阳性(ER+)和孕激素受体阳性(PR+)的乳腺癌患者中表达量明显上调(图2-D、图2-E和图2-F)。相较于基底细胞样型(Basal-like)和三阴性乳腺癌(TNBC),*GATA3-AS1*在非基底细胞样型和非三阴性乳腺癌中的表达水平更高(图2-G和图2-H)。综合数据库中*GATA3-AS1*在乳腺癌各类分子亚型中表达水平可看出,激素受体A阳性(luminal A)乳腺癌*GATA3-AS1*表达水平显著高于其他亚型(图2-I)。另外,IncAtlas在线数据库显示*GATA3-AS1*在人乳腺癌细胞(MCF-7)中主要分布于细胞核内(图2-J),表明该LncRNA可能参与细胞核内的转录调控。

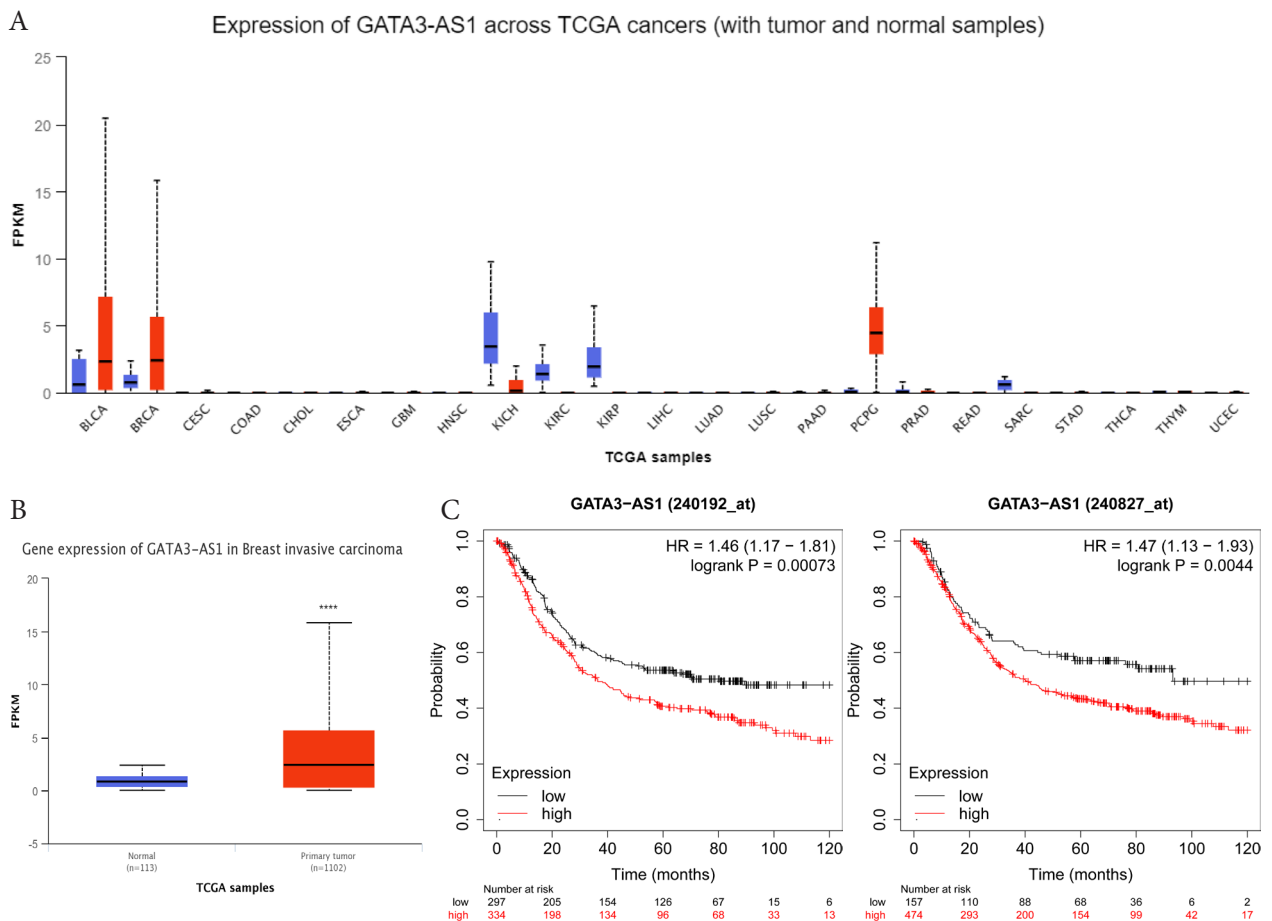


图1 *GATA3-AS1*的表达水平与预后分析

Figure 1. The relationship between the expression level of *GATA3-AS1* and the prognosis of breast cancer

注: A.UALCAN在线数据库不同肿瘤组织*GATA3-AS1*的表达分析; B.UALCAN在线数据库乳腺癌组织与正常组织*GATA3-AS1*表达水平的分析(\*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ); C.Kaplan-Meier生存曲线提示高表达*GATA3-AS1*与乳腺癌预后不良相关

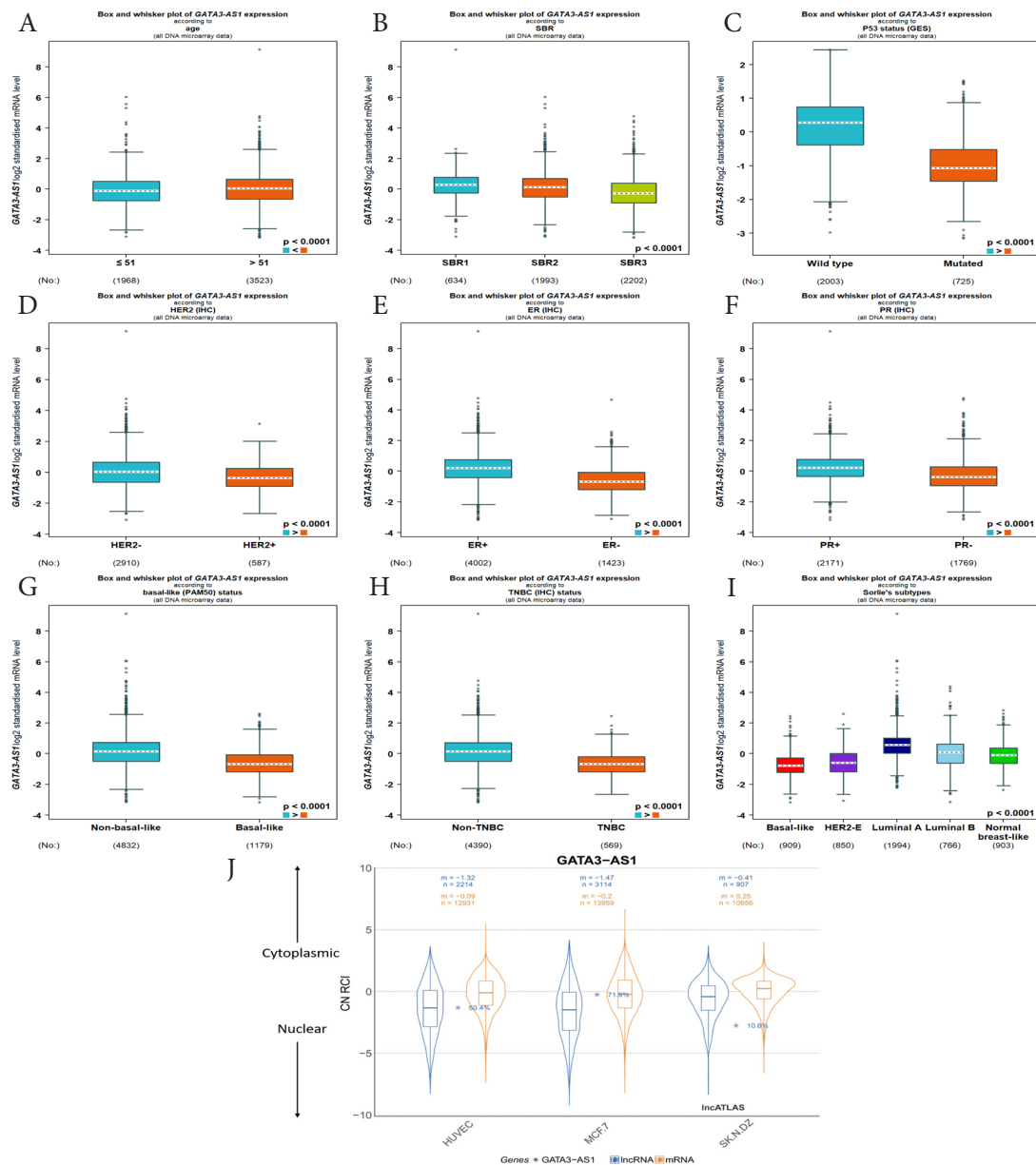


图2 bc-GenExMiner在线数据库关于*GATA3-AS1*的表达水平与乳腺癌不同临床病理特征关系的分析  
 Figure 2. The relationship between the expression level of *GATA3-AS1* and different clinicopathological features of breast cancer was analysed via bc-GenExMiner online database

注：A、B和C分别表示*GATA3-AS1*的表达水平与乳腺癌患者的年龄、SBR等级以及P53基因突变之间的相关性；D、E和F分别表示*GATA3-AS1*的表达水平与人类表皮生长因子受体2 (HER2-)、雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 之间的相关性；G和H表示*GATA3-AS1*在非基底细胞样型和非三阴性乳腺癌中的表达水平更高；I表示*GATA3-AS1*在乳腺癌各分子亚型中的表达水平；J表示lncATLAS在线数据库预测*GATA3-AS1*的细胞定位

## 2.2 *GATA3-AS1*促进乳腺癌细胞的增殖与转移

本研究通过 qRT-PCR 对人类乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231 和 MCF-7) 以及正常乳腺上皮细胞系 (MCF-10A) 中 *GATA3-AS1* 的表达水平进行验证, 结果显示, 与 MCF-10A 细胞相比, *GATA3-AS1* 在 MDA-MB-231 和 MCF-7 中显著高表达 ( $P < 0.001$ , 图 3-A)。核质分离提示 *GATA3-AS1* 主要位于 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞核内

(图 3-B), 推测 *GATA3-AS1* 可能通过影响乳腺癌细胞核内相关基因转录调控乳腺癌的发生发展。此外, 通过 shRNA 获得低表达 *GATA3-AS1* 的乳腺癌细胞株, 对该细胞株的多种生物功能变化进行观察, qRT-PCR 证实 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的 *GATA3-AS1* 可被 shRNA 有效沉默 ( $P < 0.001$ ), 且 sh1 的沉默效率高于 sh2, 达到 80% (图 3-C)。因此, 本研究使用 sh1 进行后续体外功能实验。

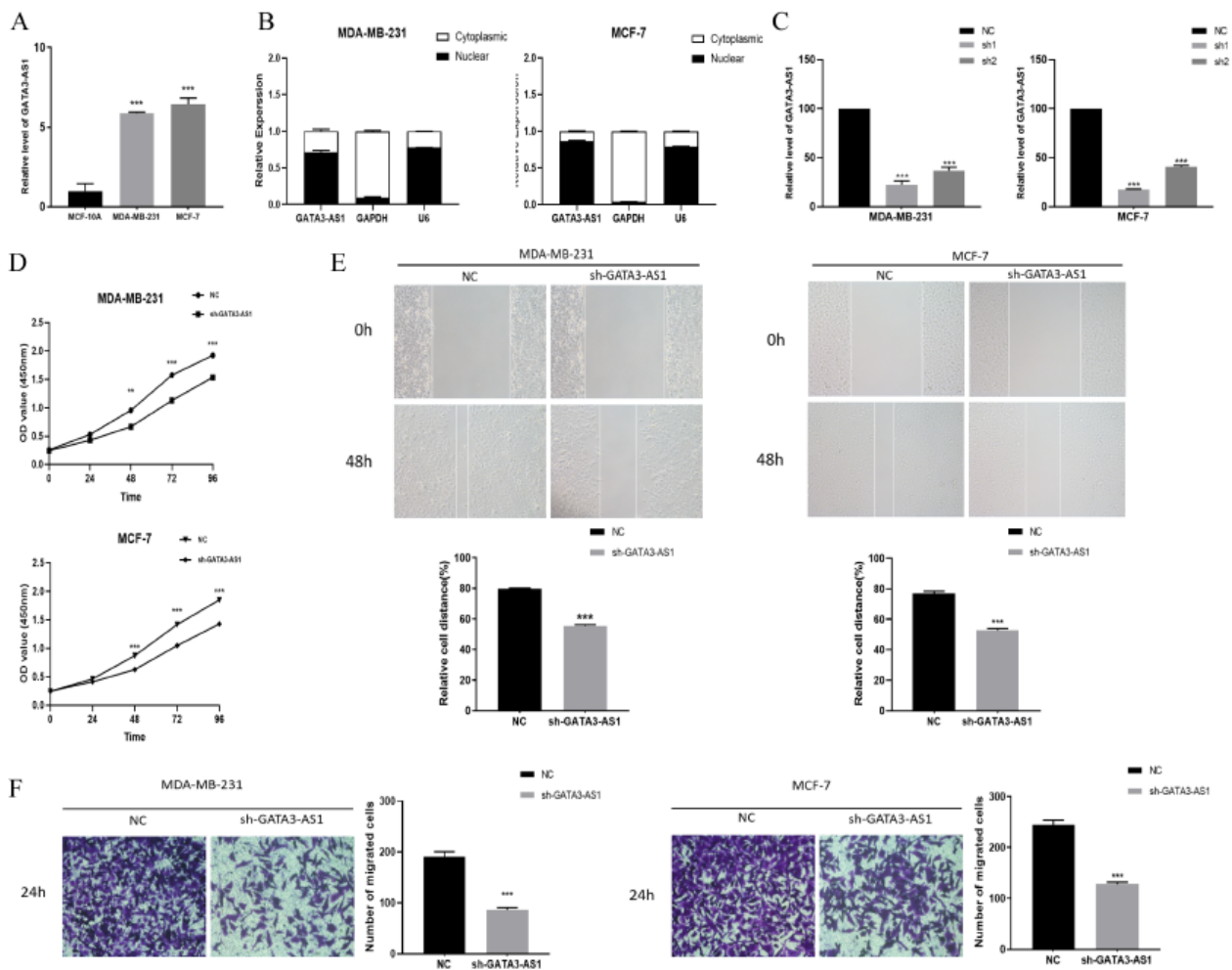


图3 *GATA3-AS1*促进乳腺癌细胞的增殖与迁移

Figure 3. *GATA3-AS1* promotes breast cancer cell proliferation and migration

注: A.qRT-PCR检测MCF-10A、MDA-MB-231和MCF-7细胞系中*GATA3-AS1*相对表达水平; B.通过核质分离和qRT-PCR鉴定MDA-MB-231和MCF-7细胞中*GATA3-AS1*的细胞定位; C.qRT-PCR检测两个shRNA的沉默效率; D、E和F分别表示使用CCK8、划痕以及Transwell实验检测沉默*GATA3-AS1*后,MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖和迁移能力的变化(\*\*: $P < 0.01$ ;\*\*\*: $P < 0.001$ )

CCK8 实验结果显示,与对照组相比,沉默 *GATA3-AS1* 后,MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖速度明显下降 ( $P < 0.001$ , 图 3-D)。后续细胞划痕实验以及 Transwell 实验证实,沉默 *GATA3-AS1* 明显抑制了乳腺癌细胞的二维及三维迁移能力 ( $P < 0.001$ , 图 3-E、图 3-F)。

### 2.3 乳腺癌组织中*GATA3*的表达与*GATA3-AS1*正相关

starBase 和 UALCAN数据库均发现 *GATA3-AS1* 的蛋白编码基因 *GATA3* 在乳腺癌中的表达与 *GATA3-AS1* 的表达呈正相关(图 4-A),且 *GATA3* 在乳腺癌中表达水平高于正常乳腺组织 ( $P < 0.001$ , 图 4-B)。Kaplan-Meier 生存曲线显示,*GATA3* 的表达与乳腺癌的总生存期显著正相关(图 4-C)。利用 bc-GenExMiner 在

线数据库分析不同临床和病理参数的乳腺癌患者 *GATA3* 的表达差异,结果显示 *GATA3* 在年龄  $\leq 51$  岁的患者中表达水平明显低于年龄  $> 51$  岁者(图 5-A),且与 SBR 等级(图 5-B)以及 *P53* 基因突变(图 5-C)存在显著相关。此外,*GATA3* 在乳腺癌各分子分型上的表达差异与 *GATA3-AS1* 的表达趋势基本一致(图 5-D、图 5-I)。

### 2.4 沉默*GATA3-AS1*导致*GATA3*蛋白水平上升

本研究对 *GATA3-AS1* 与其蛋白编码基因 *GATA3* 所表达的蛋白进行相关性分析。蛋白印迹实验结果显示,沉默 *GATA3-AS1* 后,MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的 *GATA3* 蛋白水平随之上升(图 6,  $P < 0.01$ )。

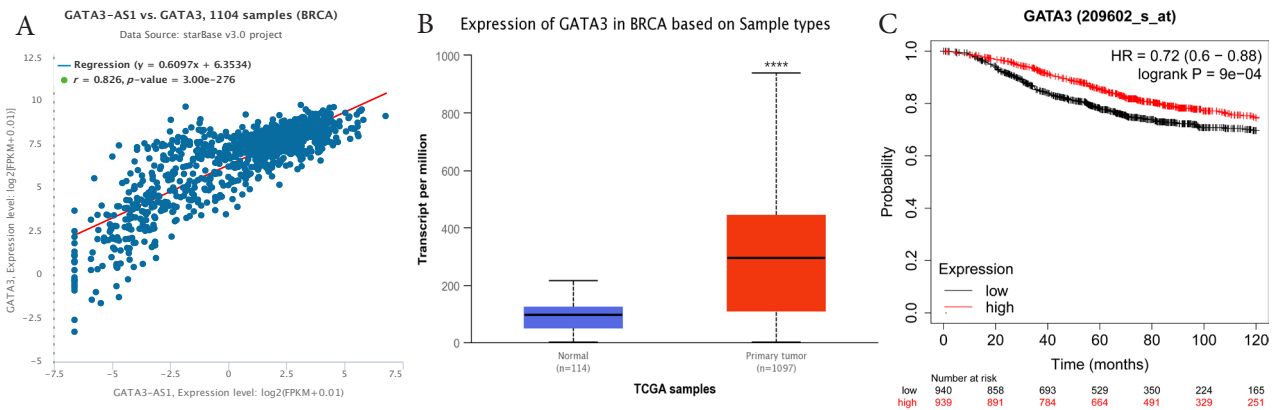


图4 与GATA3-AS1表达相关基因的预测

Figure 4. Prediction of genes that associated with *GATA3-AS1* expression

注：A.starBase数据库预测GATA3的表达与GATA3-AS1呈正相关；B.UALCAN在线数据库显示乳腺癌组织GATA3的表达水平较正常组织高(\*\*\*\*, P<0.0001)；C.Kaplan-Meier生存曲线提示GATA3的表达与乳腺癌预后正相关

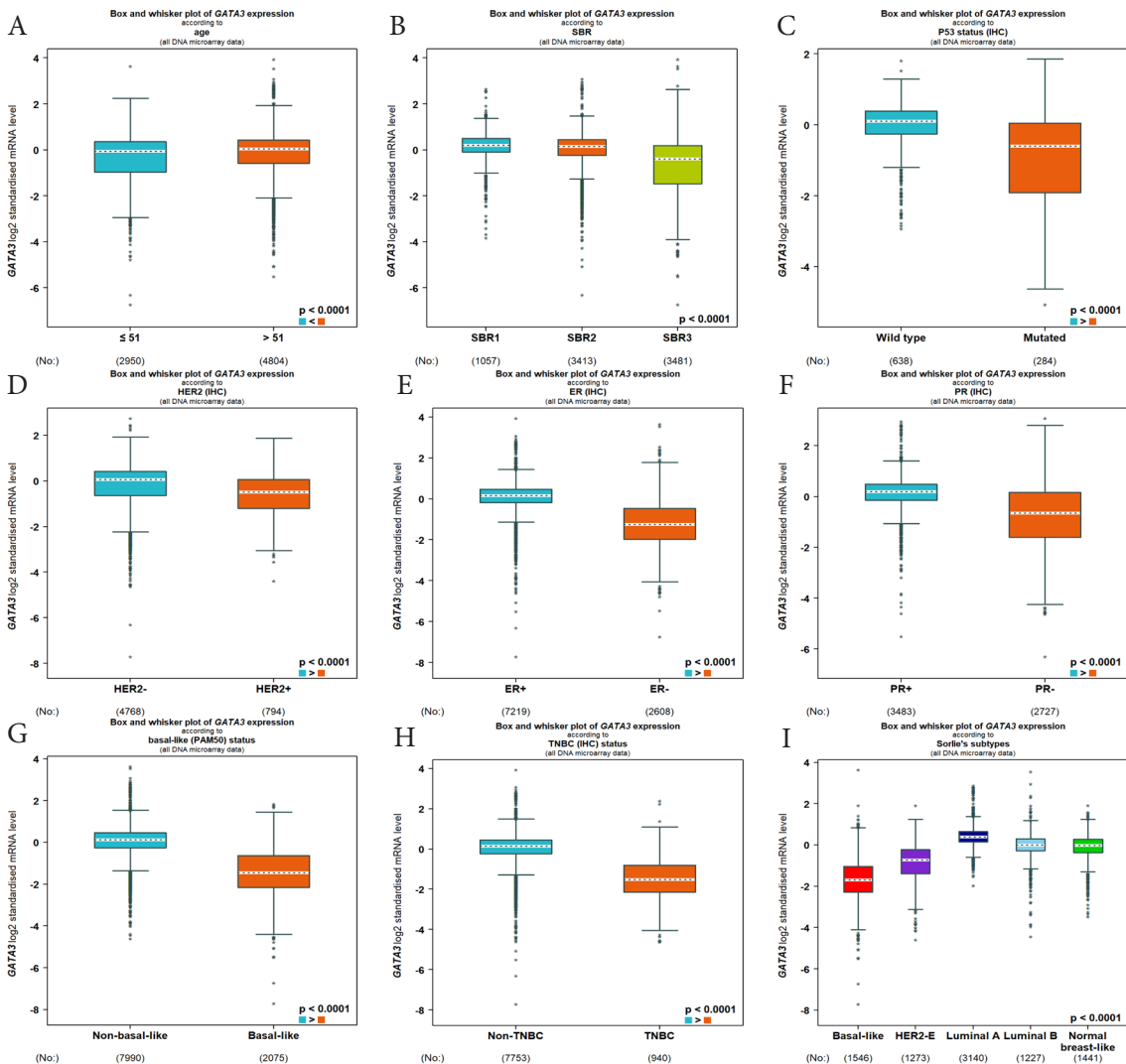


图5 bc-GenExMiner在线数据库对GATA3的表达水平与乳腺癌不同临床病理特征关系的分析

Figure 5. The relationship between the expression level of *GATA3* and different clinicopathological features of breast cancer was analysed via bc-GenExMiner online database

注：A、B和C分别表示GATA3的表达水平与乳腺癌患者的年龄、SBR等级以及P53基因突变之间的相关性；D、E和F分别表示GATA3的表达水平与人类表皮生长因子受体2 (HER2-)、雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 之间的相关性；G和H表示GATA3在非基底细胞样型和非三阴性乳腺癌中的表达水平更高；I.GATA3在乳腺癌各分子亚型中的表达水平

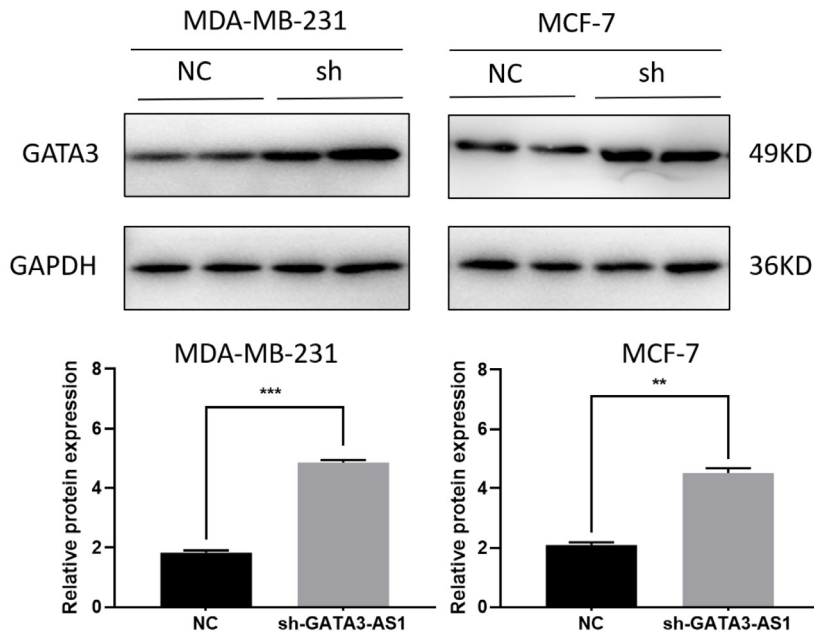


图6 沉默*GATA3-ASI*之后*GATA3*蛋白水平上升

Figure 6. The protein level of *GATA3* increases after the silencing of *GATA3-ASI*

注: \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

### 3 讨论

LncRNA 在细胞生长和分化、免疫激活 / 失活、转录和转录后调控等多种生物学过程中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。近期研究证实多种 LncRNA 参与乳腺癌的发生发展, 如 LncRNA *HOTAIR* 通过激活 *STAT3* 信号通路, 参与乳腺癌组织的上皮-间充质转化<sup>[17]</sup>; LncRNA *FGF13-ASI* 通过抑制乳腺癌细胞糖酵解和干性特性起肿瘤抑制作用<sup>[18]</sup>。作为基因反义链的转录产物, 反义 LncRNA 也参与了疾病复杂的病理生理过程<sup>[19]</sup>。*GATA3-ASI* 作为一种新型反义 LncRNA, 在人类 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群中首次被发现<sup>[20]</sup>。Zhu 等应用生物信息学技术对人类膀胱癌组织中的 LncRNA 表达谱进行分析, 发现 *GATA3-ASI* 在膀胱癌组织中显著上调<sup>[21]</sup>。Luo 等研究也证实 *GATA3-ASI* 可通过沉默抑癌基因促进肝细胞癌细胞增殖和转移<sup>[15]</sup>。

本研究对乳腺癌细胞中 *GATA3-ASI* 表达水平进行检测, 结果显示相较正常的乳腺细胞, *GATA3-ASI* 在乳腺癌细胞系中的表达显著上调。进一步通过 UALCAN 数据库分析发现, *GATA3-ASI* 高表达的乳腺癌患者预后较差, 推测在乳腺癌的发生发展中, *GATA3-ASI* 发挥促癌作用。bc-GenExMiner 数据库分析显示, *GATA3-ASI* 在

非基底细胞样型和非三阴性乳腺癌中的表达水平显著高于基底细胞样型和三阴性乳腺癌, 而共认为三阴性乳腺癌往往预后较差。导致结果矛盾的原因可能为: 首先, 在 UALCAN 数据库中有关 *GATA3-ASI* 生存分析的对象是未分层的全体乳腺癌患者, 未对乳腺癌亚型进行分层预测; 其次, 不同数据库间纳入的样本存在差异, 结果不具有严格意义上的可比性; 最后, 乳腺癌的发生发展受多基因多因素综合调控, 且不同亚型乳腺癌中, LncRNA 发挥的作用可能不尽相同。尽管如此, 上述生物信息学分析结果提示 *GATA3-ASI* 作为潜在生物标志物, 在乳腺癌早期预测、疗效评价及预后评估方面具有一定价值。然而, *GATA3-ASI* 与乳腺癌预后关系及其在乳腺癌发生发展中的具体机制, 仍需大样本、分层深入的研究。

本研究还利用乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 对 *GATA3-ASI* 进行了体外功能实验, 下调 *GATA3-ASI* 的表达抑制了 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖和迁移能力, 证实 *GATA3-ASI* 可能在乳腺癌的进展中起促癌作用。研究进一步对 *GATA3-ASI* 在乳腺癌中发挥的作用机制进行探讨。通过 starBase 数据库预测发现, *GATA3-ASI* 的蛋白编码基因 *GATA3* 在乳腺癌中的表达与 *GATA3-ASI* 呈正相关。有研究表明, 反义



LncRNA 基因转录起始位点与其蛋白编码基因转录起始位点并在一起,可能与 mRNA 的基因启动子或近端增强子存在竞争关系,进而影响 mRNA 的转录过程<sup>[22-24]</sup>。

*GATA3* 在淋巴细胞、乳腺、中枢神经系统、内耳和甲状旁腺等多种人体组织中均有表达,且其表达是这些器官发育的基础,它的失调与急性 T 细胞淋巴样白血病、乳腺癌、神经母细胞瘤、感音神经性耳聋和甲状旁腺机能减退等多种疾病相关<sup>[25]</sup>。其中,*GATA3* 的表达与乳腺癌预后的关联已有一定研究基础。Mehra 等报道了高表达 *GATA3* 患者 10 年生存率高于低表达患者 (84% vs. 55%),表明低表达 *GATA3* 提示预后不良<sup>[26]</sup>。另一项为期 10 年的随访研究发现,与低表达 *GATA3* 肿瘤相比,高表达 *GATA3* 的肿瘤发生激素无反应的风险降低了近 90%,且预后更好<sup>[27]</sup>。*GATA3* 作为肿瘤抑制因子<sup>[28-29]</sup>,是 *GATA3-ASI* 的蛋白编码基因,且又与 *GATA3-ASI* 共享一个启动子区域<sup>[30]</sup>。此外,核质分离证实 *GATA3-ASI* 定位于 MDA-MB-231 和 MCF-7 的细胞核内,进一步通过蛋白印迹实验证实,在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中下调 *GATA3-ASI* 表达后,*GATA3* 蛋白水平明显上升,即二者的表达量呈负相关。然而,此结果与 starBase 数据库预测结果相反。究其原因,一方面可能是在运用 starBase 数据库预测二者表达量之间关系时,是在 mRNA 水平分析获得,而实验结果是在蛋白水平上实践得出,结果之间可能存在转录后调控所致的表达差异;另一方面,*GATA3* 被认为是乳腺建立和发育过程中不可或缺的转录因子,在乳腺癌中参与多种分子调控机制<sup>[31-35]</sup>,因此 *GATA3* 蛋白的表达受多基因影响,并不一定完全由 *GATA3-ASI* 调控。由此猜测 *GATA3-ASI* 可能通过抑制其蛋白编码基因 *GATA3* 的表达促进乳腺癌的发展,可能成为乳腺癌治疗的新靶点。

生存分析显示,高表达 *GATA3* 的乳腺癌患者预后更好,与既往研究一致。此外,通过 bc-GenExMiner 数据库对不同临床和病理参数的乳腺癌患者 *GATA3* 的表达差异进行分析,结果显示具有抑癌作用的 *GATA3* 与具有促癌机制的 *GATA3-ASI* 在表达量方面与乳腺癌患者的临床病理特征间的相关性趋势十分相似。这是否意味着 *GATA3-ASI* 与 *GATA3* 之间存在某种平衡,尚有待进一步

研究。

基于细胞学实验可知,*GATA3-ASI* 在乳腺癌组织和细胞中表达上调。*GATA3-ASI* 可能通过抑制其蛋白编码基因 *GATA3* 的表达,参与调控乳腺癌细胞的增殖和迁移。

## 参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel R, 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 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会,中国抗癌协会乳腺癌专业委员会,中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会.中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2020版)[J].中华肿瘤杂志,2020,42(10):781-797.[Breast Cancer Expert Committee of National Cancer Quality Control Center, Breast Cancer Expert Committee of China Anti-Cancer Association, Cancer Drug Clinical Research Committee of China Anti-Cancer Association. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of advanced breast cancer in China (2020 Edition)[J]. Chinese Journal of Oncology, 2020, 42(10): 781-797.] DOI: 10.3760/cma.j.cn.112152-20200817-00747.
- 3 Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, et al. Breast cancer in young women: an overview[J]. Updates Surg, 2017, 69(3): 313-317. DOI: 10.1007/s13304-017-0424-1.
- 4 Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs[J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81: 145-166. DOI: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.
- 5 Atianand MK, Caffrey DR, Fitzgerald KA. Immunobiology of long noncoding RNAs[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 26(35): 177-198. DOI: 10.1146/annurev-immunol-041015-055459.
- 6 Yang F, Fang E, Mei H, et al. Cis-Acting circ-CTNNB1 promotes  $\beta$ -catenin signaling and cancer progression via DDX3-mediated transactivation of YY1[J]. Cancer Res, 2019, 79(3): 557-571. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1559.
- 7 Wang Z, Yang B, Zhang M, et al. lncRNA epigenetic landscape analysis identifies EPIC1 as an oncogenic lncRNA that interacts with MYC and promotes cell-cycle progression in cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 706-720. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.006.

- 8 Slack FJ, Chinnaiyan AM. The role of non-coding RNAs in oncology[J]. *Cell*, 2019, 179(5): 1033–1055. DOI: [10.1016/j.cell.2019.10.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017).
- 9 Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs[J]. *RNA Biol*, 2013, 10(6): 925–933. DOI: [10.4161/rna.24604](https://doi.org/10.4161/rna.24604).
- 10 Wang Y, Dang Y, Liu J, et al. The function of homeobox genes and lncRNAs in cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1635–1641. DOI: [10.3892/ol.2016.4901](https://doi.org/10.3892/ol.2016.4901).
- 11 Zhang Z, Sun L, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes breast cancer stemness and tumorigenesis via targeting miR-30a/Nanog axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8630–8638. DOI: [10.1002/jcp.26611](https://doi.org/10.1002/jcp.26611).
- 12 Yuan SX, Tao QF, Wang J, et al. Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2014, 349(1): 87–94. DOI: [10.1016/j.canlet.2014.03.029](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.029).
- 13 He J, Wu K, Guo C, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 plays an oncogenic role in promoting cell migration in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(24): 4667–4681. DOI: [10.1007/s00018-018-2923-8](https://doi.org/10.1007/s00018-018-2923-8).
- 14 Hu G, Tang Q, Sharma S, et al. Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(11): 1190–1198. DOI: [10.1038/ni.2712](https://doi.org/10.1038/ni.2712).
- 15 Luo X, Zhou N, Wang L, et al. Long noncoding RNA GATA3-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by suppression of PTEN, CDKN1A, and TP53[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 2019: 1389653. DOI: [10.1155/2019/1389653](https://doi.org/10.1155/2019/1389653).
- 16 Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(14): 6391–6400. DOI: [10.1093/nar/gks296](https://doi.org/10.1093/nar/gks296).
- 17 Zhang H, Cai K, Wang J, et al. MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(11): 2858–2868. DOI: [10.1002/stem.1795](https://doi.org/10.1002/stem.1795).
- 18 Ma F, Liu X, Zhou S, et al. Long non-coding RNA FGF13-AS1 inhibits glycolysis and stemness properties of breast cancer cells through FGF13-AS1/IGF2BPs/Myc feedback loop[J]. *Cancer Lett*, 2019, 450: 63–75. DOI: [10.1016/j.canlet](https://doi.org/10.1016/j.canlet).
- 19 Yu W, Gius D, Onyango P, et al. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 202–206. DOI: [10.1038/nature06468](https://doi.org/10.1038/nature06468).
- 20 Zhang H, Nestor CE, Zhao S, et al. Profiling of human CD4+ T-cell subsets identifies the TH2-specific noncoding RNA GATA3-AS1[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(4): 1005–1008. DOI: [10.1016/j.jaci.2013.05.033](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.05.033).
- 21 Zhu YP, Bian XJ, Ye DW, et al. Long noncoding RNA expression signatures of bladder cancer revealed by microarray[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(4): 1197–1202. DOI: [10.3892/ol.2014.1843](https://doi.org/10.3892/ol.2014.1843).
- 22 Wu X, Sharp PA. Divergent transcription: a driving force for new gene origination[J]. *Cell*, 2013, 155(5): 990–996. DOI: [10.1016/j.cell.2013.10.048](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.048).
- 23 Gomez JA, Wapinski OL, Yang YW, et al. The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- $\gamma$  locus[J]. *Cell*, 2013, 152(4): 743–754. DOI: [10.1016/j.cell.2013.01.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.015).
- 24 Almada AE, Wu X, Kriz AJ, et al. Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals[J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 360–363. DOI: [10.1038/nature12349](https://doi.org/10.1038/nature12349).
- 25 Romano O, Miccio A. GATA factor transcriptional activity: insights from genome-wide binding profiles[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(1): 10–26. DOI: [10.1002/iub.2169](https://doi.org/10.1002/iub.2169).
- 26 Mehra R, Varambally S, Ding L, et al. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11259–11264. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-05-2495](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2495).
- 27 Ciocca V, Daskalakis C, Ciocca RM, et al. The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study[J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(4): 489–495. DOI: [10.1016/j.humpath.2008.09.010](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.09.010).
- 28 Kamel NA, Abdelzاهر E, Elgebaly O, et al. Reduced expression of GATA3 predicts progression in non-muscle invasive urothelial carcinoma of the urinary bladder[J]. *J Histotechnol*, 2020, 43(1): 21–28. DOI: [10.1016/j.humpath.2008.09.010](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.09.010).

- 10.1080/01478885.2019.1667126.
- 29 Yin G, Liu Z, Wang Y, et al. ZNF503 accelerates aggressiveness of hepatocellular carcinoma cells by down-regulation of GATA3 expression and regulated by microRNA-495[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(6): 3426–3437. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31312355/>.
- 30 Gibbons HR, Shaginurova G, Kim LC, et al. Divergent lncRNA GATA3-AS1 Regulates GATA3 Transcription in T-Helper 2 Cells[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2512. DOI: [10.3389/fimmu.2018.02512](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02512).
- 31 Kouros MH, Kim JW, Bechis SK, et al. GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 164–170. DOI: [10.1016/j.ceb.2008.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.02.003).
- 32 Eeckhoutte J, Keeton EK, Lupien M, et al. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6477–6483. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-07-0746](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0746).
- 33 Theodorou V, Stark R, Menon S, et al. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility[J]. Genome Res, 2013, 23(1): 12–22. DOI: [10.1101/gr.139469.112](https://doi.org/10.1101/gr.139469.112).
- 34 Bai F, Zhang LH, Liu X, et al. GATA3 functions downstream of BRCA1 to suppress EMT in breast cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(17): 8218–8233. DOI: [10.7150/thno.59280](https://doi.org/10.7150/thno.59280).
- 35 Na K, Woo HY, DO SI, et al. Combination of GATA3, SOX-10, and PAX8 in a comprehensive panel to diagnose breast cancer metastases[J]. In Vivo, 2022, 36(1): 473–481. DOI: [10.21873/invivo.12727](https://doi.org/10.21873/invivo.12727).

收稿日期: 2022 年 02 月 20 日 修回日期: 2022 年 03 月 21 日

本文编辑: 李 阳 曹 越

引用本文: 江琪, 习一清, 魏蕾. LncRNA *GATA3-AS1* 促进乳腺癌细胞的增殖迁移及其机制 [J]. 医学新知, 2022, 32(2): 127–137. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202202018](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202202018)

Jiang Q, Xi YQ, Wei L. LncRNA *GATA3-AS1* promotes the proliferation and migration of breast cancer cells and the mechanisms underlying its action[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2022, 32(2): 127–137. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202202018](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202202018)