

·生物信息学·

# 长链非编码 TINCR 介导乳腺癌化疗耐药的生物信息学分析

董春涛,王思琪,费浩然,司鑫鑫,石晓

(江苏海洋大学药学院/江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室,江苏 连云港 222005)

**摘要:**目的 探讨长链非编码 RNA-TINCR 在耐药性乳腺癌中的表达、生物学功能、相关信号通路及其与患者预后的关系。方法 利用 GEPIA 在线数据库比较人乳腺癌组织和正常组织中 TINCR 基因的 mRNA 的相对表达水平,通过 qPCR 方法验证敏感、耐药乳腺癌细胞中 TINCR 的表达量,借助 Kaplan-Meier plotter 在线数据库分析 TINCR 表达量高低与乳腺癌患者生存预后的关系。采用 CCK8 法检测改变 TINCR 表达量对肿瘤细胞化疗敏感性的改变,Metascape 在线数据库预测 TINCR 的相互作用蛋白,借助 DAVID 对相关基因功能进行 GO 和 KEGG 信号通路功能富集分析。最后初步探讨耐药细胞中异常表达的 TINCR 是如何产生的。结果 TINCR 在乳腺癌组织及耐药乳腺癌细胞中高表达,升高 TINCR 表达水平可促进乳腺癌细胞对化疗药物的耐药,分析出 TINCR 相互作用蛋白有 150 个,这些蛋白调控蛋白质翻译、mRNA 和 rRNA 的加工、mRNA 的出核转运、核糖体小亚基的形成等生物学过程,信号通路富集结果主要分布在核糖体、冠状病毒疾病、剪切体、核质运输、mRNA 监测通路等方面。TINCR 启动子区具有 ER $\alpha$  结合,且使用 ER $\alpha$  抑制剂可显著抑制 TINCR 表达量。结论 TINCR 在耐药乳腺癌细胞中呈高表达水平,与患者的预后不良有关,对乳腺癌化疗耐药的预测具有重要意义。

**关键词:** TINCR;乳腺癌;化疗耐药;生物信息学

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.15.001

文章编号:1006-1959(2023)15-0001-06

## Bioinformatics Analysis of Long Non-coding TINCR-mediated Chemotherapy Resistance in Breast Cancer

DONG Chun-tao, WANG Si-qi, FEI Hao-ran, SI Xin-xin, SHI Xiao

(School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University/Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression, biological function, signaling pathways and prognosis of long non-coding RNA-TINCR in drug-resistant breast cancer. **Methods** The GEPIA online database was used to compare the relative expression level of TINCR mRNA in human breast cancer tissues and normal tissues. The expression levels of TINCR in sensitive and resistant breast cancer cells were verified by qPCR method. Kaplan-Meier plotter online database was used to analyze the relationship between TINCR expression level and survival prognosis of breast cancer patients. CCK8 assay was used to detect the change of TINCR expression level on the sensitivity of tumor cells to chemotherapy. The Metascape online database was further used to predict the interacting proteins of TINCR, and the function enrichment analysis of GO and KEGG signaling pathways was conducted with the help of DAVID. Finally, we preliminarily explored how the abnormal expression of TINCR in drug-resistant cells was generated. **Results** TINCR was highly expressed in breast cancer tissues and drug-resistant breast cancer cells. Elevated TINCR expression level could promote the resistance of breast cancer cells to chemotherapeutic drugs; a total of 150 TINCR-interacting proteins were finally screened. These proteins regulated biological processes such as protein translation, mRNA and rRNA processing, mRNA nuclear export transport, and ribosomal small subunit formation. The results of signal pathway enrichment were mainly distributed in ribosomes, coronavirus diseases, spliceosomes, nucleoplasmic transport, mRNA monitoring pathways, etc. The TINCR promoter region had ER $\alpha$  binding, and the use of ER $\alpha$  inhibitors could significantly inhibit TINCR expression. **Conclusion** TINCR is highly expressed in drug-resistant breast cancer cells, which is related to the poor prognosis of patients, and is of great significance for the prediction of chemotherapy resistance in breast cancer.

**Key words:** TINCR; Breast cancer; Chemotherapy resistance; Bioinformatics

乳腺癌(breast cancer)是一种高度异质性的肿瘤,是我国女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,其在组织

形态、免疫表型、生物学行为及治疗反应上存在着极大的差异,其发病率和死亡率呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。化疗作为乳腺癌的重要治疗手段之一,虽已取得了不错的疗效,但随之而来的药物耐受成为了限制化疗疗效的主要瓶颈。研究发现<sup>[3]</sup>,雌激素受体(ER)阳性的乳腺癌患者对一线化疗药物更易产生耐药性,潜在的机制仍有待进一步阐明。近年来长链非编码 RNA(lncRNA)在肿瘤耐药中的作用受到广泛关注。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81703557)

作者简介:董春涛(1997.9-),男,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事肿瘤分子生物学研究

通讯作者:石晓(1990.9-),女,江苏连云港人,博士,讲师,主要从事肿瘤分子生物学研究

组织分化诱导的非蛋白质编码 RNA(tissue differentiation-inducing non-protein coding RNA, TINCR)是位于人类 19p13.3 染色体上的 lncRNA,在多种肿瘤中表达显著升高,并通过靶向癌症相关信号通路中的关键分子影响肿瘤的发生、发展<sup>[4]</sup>。如在口腔鳞癌中,过表达 TINCR 可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进细胞增殖和转移<sup>[5]</sup>;在胃癌中,TINCR 可通过靶向 Kruppel Like Factor 2(KLF4)基因抑制细胞凋亡<sup>[6]</sup>。相关研究显示<sup>[7]</sup>,TINCR 通过调节 miR-125b 及其靶基因 ERBB2 的表达在刺激肿瘤发生中的作用,并且它与 miR-125b 的相互作用已被证明可以释放 HER-2 并促使曲妥珠单抗耐药。有研究发现三阴性乳腺癌患者血清中的 TINCR 增高,与肿瘤增殖、侵袭和迁移有关,具有潜在的预测价值<sup>[8]</sup>,但 TINCR 在乳腺癌化疗耐药中的作用及其异常表达机制尚不清楚。因此,本研究借助 GEPIA 在线数据库、Kaplan-Meier plotter 在线数据库、Metascape 在线数据库,通过 qPCR 和 CCK8 实验,分析了长链非编码 RNA-TINCR 在耐药性乳腺癌中的表达、生物学功能、相关信号通路及其与患者预后的关系,并进一步探讨了 TINCR 在肿瘤化疗耐药中的作用,旨在为临床研发逆转耐药的分子靶向治疗提供新的潜在靶点,为改进乳腺癌化疗策略提供新的思路。

## 1 资料与方法

**1.1 TINCR 基因表达分析** 使用 GEPIA 在线数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析 TINCR 在癌和癌旁的表达水平。进入网站后,选择 Expression DIY 模块后,输入基因名字,选择癌症种类为“BRCA”(乳腺癌),点击 plot 后等待结果生成。

**1.2 生存分析** 使用 Kaplan-Meier 生存曲线分析网站(<http://kmplot.com/analysis/>)分析 TINCR 在乳腺癌患者中的生存关系。选择“Auto select best cutoff”和生存分析的类型后,点击 draw Kaplan-Meier plotter,保存生成的结果。

**1.3 TINCR 相互作用蛋白预测** 借助 catRAPID([http://service.tartagialab.com/page/catrapid\\_group](http://service.tartagialab.com/page/catrapid_group))进行预测,选择“catRAPID omics v2.0”模块,继续选择“transcripts VS RNA-binding proteome”。选择所要分析的 RNA 类型为“long non-coding RNAs”,种属为“Homo sapiens”,输入 RNA 的序列,点击提交并保存结果。

**1.4 基因本体 (GO) 分析和基因组京都百科全书 (KEGG) 富集分析** 利用 DAVID 数据库对筛选得到的相互作用蛋白进行 GO 分析进行富集,包括了基因的细胞成分(cellular component, CC)、生物学过程(biological process, BP)和分子功能(molecular function, MF)层面的内容。此外进行 KEGG 分析,其包含了基因组学、系统功能组学和生物化学的信息,是系统分析基因组信息和基因功能的数据库,有利于把基因及其表达信息整合起来进行研究。校正  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

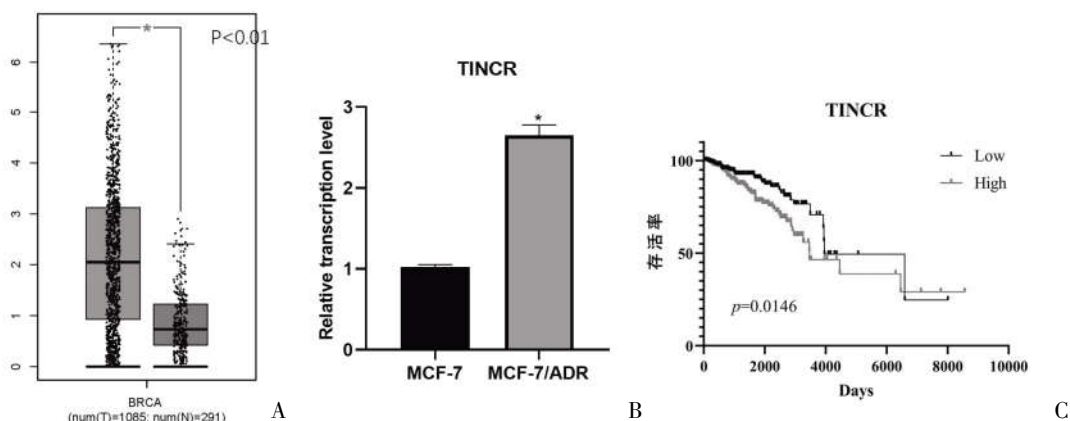
**1.5 细胞培养** MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞维持在含有 1% 青霉素/链霉素和 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基中,并在 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。根据细胞生长的情况和实验要求,隔 1~2 d 换 1 次完全培养液。待细胞满培养皿底面 80%~90% 时,进行传代。

**1.6 定量 PCR** 根据 Trizol 试剂 (RNA isolater Total RNA Extraction Reagent, 诺唯赞) 操作说明书提取细胞总 RNA, 使用逆转录试剂盒 [HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper), 诺唯赞] 将 RNA 逆转录成 cDNA。根据定量扩增试剂盒 (AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 诺唯赞) 说明书要求,加入扩增溶液,将实时荧光定量 PCR 仪开启预热 10 min。上机前设置反应条件为: 在 95 °C 预变性 15 min, 在 95 °C 变性 10 s, 在 60 °C 退火 20 s, 在 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。

**1.7 细胞活力检测** 将处理好的细胞接种于 96 孔板中,密度为  $5 \times 10^3$  个/孔。第 2 天,加入不同浓度的阿霉素处理细胞,48 h 后在每个孔中加入 10  $\mu$ l CCK8 溶液孵育 2 h。最后,在酶标仪上 450 nm 波长下测定吸光度。

## 2 结果

**2.1 LncRNA TINCR 在化疗耐药乳腺癌细胞中高表达** GEPIA 在线数据库显示,TINCR 在乳腺癌组织中的表达水平明显高于正常组织, 差有统计学意义(图 1A)。qRT-PCR 结果显示,与敏感细胞相比,TINCR 的表达水平在乳腺癌耐阿霉素细胞株中显著升高(图 1B)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,TINCR 的表达水平与乳腺癌患者的预后呈负相关,TINCR 表达水平高的患者 RFS 显著缩短(图 1C)。



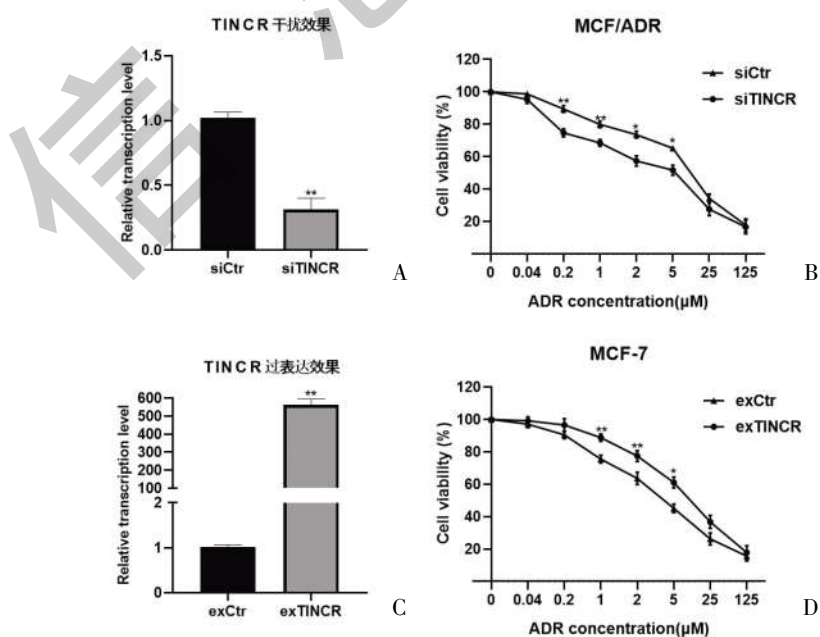
注:A:TINCR 在乳腺癌组织表达高于癌旁组织;B:TINCR 在乳腺癌耐药细胞表达高于敏感细胞;C:TINCR 的高表达和乳腺癌患者不良预后相关

图 1 TINCR 在乳腺癌细胞中的表达且其与预后的关系

**2.2 TINCR 对乳腺癌细胞化疗耐药的影响** 在 TINCR 高表达的耐药细胞中转染 TINCR 干扰片段(图 2A),TINCR 被有效干扰。MTT 结果显示,干扰 TINCR 可显著降低阿霉素药物处理下细胞存活率,即可抑制乳腺癌细胞对阿霉素的耐受性(图 2B)。在 TINCR 低表达的敏感细胞中转染 TINCR 过表达质粒,用不同浓度的阿霉素处理细胞,结果显示,过表达 TINCR 细胞的存活率显著高于对照组,即升高 TINCR 表达水平可促进乳腺癌细胞对阿霉素的耐药性(图 2C、图 2D)。

**2.3 TINCR 可能参与肿瘤发生发展的相关通路** 通

过 catRAPID 对 TINCR 在细胞内的相互作用蛋白进行了预测分析,得到 150 个候选蛋白,并进一步对这些靶基因进行生物学功能注释和信号通路分析(图3)。生物学过程主要富集于蛋白质翻译、mRNA 和 rRNA 的加工、mRNA 的出核转运、核糖体小亚基的形成等过程。细胞组分主要富集于核质、胞浆、核仁、核糖体、线粒体内膜等。分子功能主要富集于蛋白质结合、RNA 结合、核糖体的结构组成等。信号通路主要富集于核糖体、冠状病毒疾病、剪切体、核质运输、mRNA 监测通路等。



注:A:TINCR 在乳腺癌耐药细胞中被有效干扰;B:干扰 TINCR 降低细胞对阿霉素的耐药性;C:TINCR 在乳腺癌敏感细胞中被有效过表达;D:过表达 TINCR 增强细胞对阿霉素耐药性

图 2 乳腺癌耐药细胞转染 TINCR 干扰片段和过表达质粒后对阿霉素的耐受性

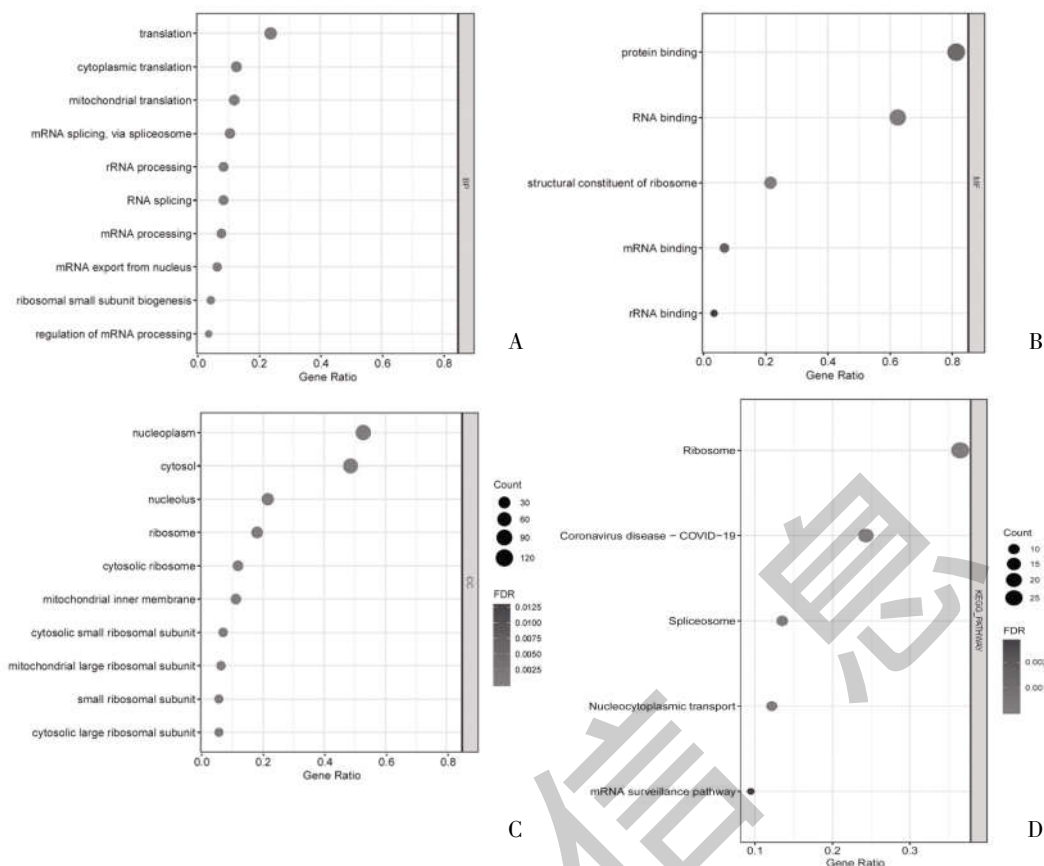
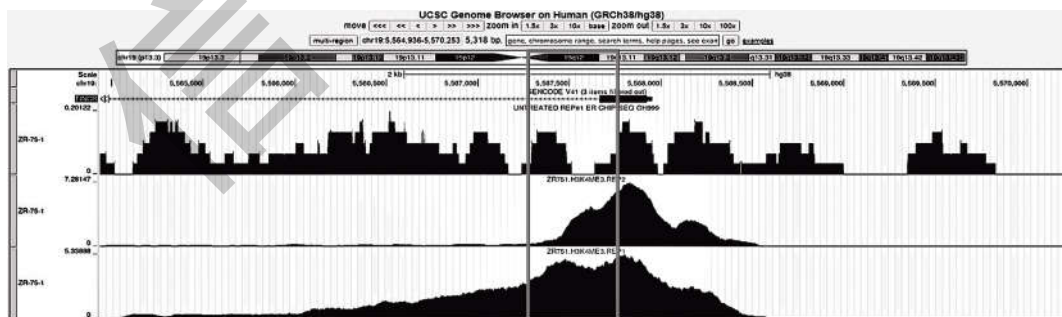


图 3 GO 富集分析(A,B,C)和 KEGG 通路分析(D)

2.4 ER $\alpha$  参与耐药细胞中 TINCR 的高表达 通过在线 ChIPseq 数据分析发现 TINCR 基因的启动子区存在大量 ER $\alpha$  结合(图 4)。ER $\alpha$  可通过结合在特定 DNA 序列上发挥转录调控功能, 并且 ER $\alpha$  与乳腺

癌化疗耐药密切相关。MCF-7 耐药细胞中给予 ER $\alpha$  抑制剂处理, 可显著抑制 TINCR 的转录水平至处理前一半。

图 4 ChIPseq 结果显示 TINCR 启动子区存在 ER $\alpha$  的结合

### 3 讨论

组织分化诱导的非蛋白质编码 RNA-TINCR 是由分化良好的人体组织中分离出来的, 为正常表皮分化所必需。近年来相关研究显示, TINCR 的异常表达与多种人类癌症发生及耐药有关, 但其在乳腺癌化疗耐药中的作用却不清楚。本研究借助实验及

生物信息学分析发现, TINCR 在乳腺癌组织及耐药乳腺癌细胞中高表达, TINCR 可促进乳腺癌细胞对化疗药物的耐药, 其表达水平与乳腺癌患者的不良预后密切相关。

本研究进一步借助生物信息学工具对 TINCR 在细胞内的相互作用蛋白进行了预测分析, 得到

150个与 TINCR 相互作用蛋白,通过 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集发现,这些蛋白调控蛋白质翻译、mRNA 和 rRNA 的加工、mRNA 的出核转运、核糖体小亚基的形成等生物学过程,信号通路富集结果主要分布在核糖体、冠状病毒疾病、剪切体、核质运输、mRNA 监测通路等方面。候选基因中 RPS19BP1、线粒体核糖体蛋白(MRPL41、MRPL42)、HADH 和 NPM1 等基因在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用,可能与乳腺癌耐药发生有关。RPS19BP1 通过对 p53、HSF1、FOXO3a、STAT3 和 mTOR 等多种蛋白的去乙酰化酶活性发挥肿瘤促进或抑制的双重作用。有研究显示<sup>[9]</sup>,在接受化疗后 1 年内未复发的乳腺癌患者中 RPS19BP1 基因表达水平相较于复发的患者明显偏低,可作为治疗乳腺癌耐药的重要靶点。已有研究表明<sup>[10]</sup>,RPS19BP1 基因在非肝硬化性肝细胞癌中过度表达与肿瘤分期、血管浸润和肿瘤大小有关,可作为重要的生物标志物用于肝细胞癌的预后研究。MRPL41 和是核编码线粒体基因,负责编码线粒体核糖体蛋白,可通过诱导细胞凋亡,在人类疾病中具有潜在的作用,但对其分子机制知之甚少。MRPL41 可以通过稳定 P53 来抑制癌细胞的异种移植肿瘤生长,并阻断细胞周期来抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[11]</sup>。MRPL42 在肺癌组织中过表达,与肺癌患者的肿瘤大小和淋巴结转移密切相关<sup>[12]</sup>。因此,MRPL41 和 MRPL42 可能作为癌症预后的重要指标,以及成为逆转乳腺癌耐药的重要靶点。HADH 基因由 10 个外显子组成,负责编码短链-L-3-羟基酰基辅酶 A 脱氢酶,催化线粒体中脂肪酸  $\beta$  氧化。在胃癌中,HADH 表达水平降低的与晚期患者有关,HADH 的缺失导致激活 Akt 信号通路,从而促进恶性肿瘤的发展<sup>[13]</sup>。另有研究证明<sup>[14]</sup>,HADH 表达下降与肾透明细胞癌预后不良和免疫浸润有关。因此,HADH 可能作为潜在的治疗靶点用于预后较差癌症的治疗。核磷素(NPM1)是一种核细胞质穿梭蛋白,可执行核糖体生物发生,染色质重塑,基因组稳定性,细胞周期进程和细胞凋亡等功能,其过表达,突变,易位或功能丧失而改变的调节可导致癌症和肿瘤发生<sup>[15]</sup>。NPM1 可以上调 PD-L1 的转录并抑制三阴性乳腺癌中的 T 细胞活性,与肿瘤的发生发展与耐药密切相关<sup>[16]</sup>。故而,RPS19BP1、MRPL41、MRPL42、HADH 和 NPM1 这 5 个关键基因,可能作为重要生物标志物用于乳腺癌耐药的早期诊断,并

为治疗乳腺癌耐药提供了重要靶点。

此外,本研究还初步分析了耐药乳腺癌细胞中异常表达的 TINCR 是如何形成的,通过生物信息学分析发现 TINCR 启动子区具有雌激素受体 ER $\alpha$  结合位点,ER $\alpha$  在乳腺癌的发生、发展及耐药中起关键作用<sup>[17]</sup>,ER $\alpha$  抑制剂可下调 TINCR 的结果提示了 ER $\alpha$  可参与调控 TINCR 的表达,但还需进一步的实验来探讨 ER $\alpha$  是如何调控 TINCR。

综上所述,TINCR 在耐药乳腺癌细胞中呈高表达水平,与患者的预后不良有关,对乳腺癌化疗耐药的预测具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1]Maughan KL,Lutterbie MA,Ham PS.Treatment of breast cancer [J].Am Fam Physician,2010,81(11):1339-1346.
- [2]Fahad Ullah M.Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status[J].Adv Exp Med Biol,2019,1152:51-64.
- [3]Finnegan RM,Elshazly AM,Schoenlein PV,et al.Therapeutic Potential for Targeting Autophagy in ER + Breast Cancer [J].Cancers (Basel),2022,14(17):4289.
- [4]Lu D,Di S,Zhuo S,et al.The long noncoding RNA TINCR promotes breast cancer cell proliferation and migration by regulating OAS1 [J].Cell Death Discov,2021,7(1):41.
- [5]Ghafouri-Fard S,Dashti S,Taheri M,et al.TINCR: An lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process [J].Non-coding RNA Res,2020,5(3):109-115.
- [6]Chen Z,Gao Y,Gao S,et al.MiR-135b-5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Krüppel-like factor 4 (KLF4) [J].Arch Med Sci,2020,16(1):167-176.
- [7]Xu S,Kong D,Chen Q,et al.Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer [J].Mol Cancer,2017,16(1):129.
- [8]Wang X,Li S,Xiao H,et al.Serum lncRNA TINCR Serve as a Novel Biomarker for Predicting the Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer [J].Technol Cancer Res Treat,2020,19:1533033820965574.
- [9]Bertozi S,Londero AP,Viola L,et al.TFEB, SIRT1, CARM1, Beclin-1 expression and PITX2 methylation in breast cancer chemoresistance: a retrospective study [J].BMC Cancer,2021,21(1):1118.
- [10]Kwon JH,Ahn KS,Moon YH,et al.AROS Is a Significant Biomarker for Tumor Aggressiveness in Non-cirrhotic Hepatocellular Carcinoma [J].J Korean Med Sci,2015,30 (9):1253-1259.

(下转第 18 页)

(上接第 5 页)

- [11]Xia J,Luo Q,Huang S,et al.Alisol B 23-acetate-induced HepG2 hepatoma cell death through mTOR signaling-initiated G1 cell cycle arrest and apoptosis:a quantitative proteomic study [J].Chinese Journal of Cancer Research,2019,31(2):375.
- [12]Jiang W,Zhang C,Kang Y,et al.MRPL42 is activated by YY1 to promote lung adenocarcinoma progression [J].J Cancer, 2021,12(8):2403-2411.
- [13]Shen C,Song YH,Xie Y,et al.Downregulation of HADH promotes gastric cancer progression via Akt signaling pathway [J].Oncotarget,2017,8(44):76279-76289.
- [14]Jiang H,Chen H,Wan P,et al.Decreased expression of HADH is related to poor prognosis and immune infiltration in kidney renal clear cell carcinoma [J].Genomics,2021,113 (6):

3556-3564.

- [15]Karimi Dermani F,Gholamzadeh Khoei S,Afshar S,et al.The potential role of nucleophosmin (NPM1) in the development of cancer[J].J Cell Physiol,2021,236(11):7832-7852.
- [16]Qin G,Wang X,Ye S,et al.NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer [J].Nat Commun,2020,11(1):1669.
- [17]Muluhngwi P,Klinge CM.Identification and Roles of miR-29b-1-3p and miR29a-3p-Regulated and Non-Regulated lncRNAs in Endocrine-Sensitive and Resistant Breast Cancer Cells [J].Cancers (Basel),2021,13(14):3530.

收稿日期:2023-02-12;修回日期:2022-02-27

编辑/肖婷婷