

· 基础研究 ·

## TUBA1C在乳腺癌中的表达及其生物学功能探讨

梅 杰,许隽颖,王惠宇,顾丁一,刘超英\*

南京医科大学附属无锡人民医院肿瘤科,江苏 无锡 214023

**[摘要]** 目的:本研究旨在系统分析微管基因超家族在乳腺癌中的表达和预后价值,并探究新的功能性微管基因。方法:使用癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)和Kaplan-Meier plotter数据库分别评估微管基因超家族在乳腺癌中的表达差异和预后价值。通过对乳腺癌组织芯片(tissue microarray,TMA)进行免疫组化(immunohistochemistry,IHC)染色验证微管蛋白 $\alpha$ 家族1c蛋白(tubulin alpha 1c,TUBA1C)的表达和预后价值。在MDA-MB-231和MCF-7乳腺癌细胞中进行了细胞增殖和凋亡分析,进而探究TUBA1C在乳腺癌细胞中的生物学功能。结果:对微管基因超家族的系统分析表明,TUBA1C在乳腺癌中高表达且具有显著的预后价值。IHC分析表明,相比癌旁正常组织,乳腺癌组织中TUBA1C在蛋白水平上高表达( $\chi^2=6.929$ , $P=0.008$ ),且TUBA1C高表达与较晚的临床分期( $\chi^2=6.357$ , $P=0.042$ )和较差的总生存期(overall survival,OS)密切相关( $P=0.021$ )。此外,单因素( $P=0.032$ )和多因素Cox回归分析( $P=0.040$ )进一步证明了TUBA1C是乳腺癌独立的预后因素。在细胞学水平上,敲低TUBA1C可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡。结论:TUBA1C是乳腺癌中的潜在癌基因和预后分子标志物。此外,敲低TUBA1C可以抑制乳腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,TUBA1C亦可作为乳腺癌治疗的潜在靶标。

**[关键词]** TUBA1C;乳腺癌;微管;预后**[中图分类号]** R737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)11-1530-09

doi:10.7655/NYDXBNS20221105

## The expression of TUBA1C and its biological functions in breast cancer

MEI Jie, XU Junying, WANG Huiyu, GU Dingyi, LIU Chaoying\*

Department of Oncology, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China

**[Abstract]** **Objective:** The current research aims to systematically analyze expression levels and prognostic values of tubulin gene superfamily members in breast cancer and identify novel functional microtubule genes. **Methods:** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Kaplan-Meier plotter database were used to define the expression levels and prognostic values of tubulin gene superfamily members in breast cancer, respectively. Expression pattern and prognostic value of tubulin alpha 1c (TUBA1C) was subsequently confirmed on breast cancer tissue microarray (TMA) by immunohistochemistry (IHC) staining. Moreover, cell viability and apoptosis assays were conducted in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells to investigate the functional role of TUBA1C in breast cancer. **Results:** Systematic analysis of tubulin gene superfamily revealed that TUBA1C was significantly overexpressed and had notable prognostic value in breast cancer. IHC analysis exhibited that the TUBA1C was overexpressed at the protein level in tumor tissues compared with para-tumor tissues ( $\chi^2=6.929$ ,  $P=0.008$ ), and upregulated TUBA1C was associated with the advanced clinical stage ( $\chi^2=6.357$ ,  $P=0.042$ ) and worse overall survival (OS) ( $P=0.021$ ). In addition, univariate ( $P=0.032$ ) and multivariate Cox regression analyses ( $P=0.040$ ) further demonstrated that TUBA1C was an independent prognostic factor in breast cancer. Besides, knockdown of TUBA1C notably suppressed cell proliferation and induced cell apoptosis. **Conclusion:** These results reveal that TUBA1C is a novel oncogene and a potential prognostic biomarker in breast cancer. Besides, silencing TUBA1C could inhibit breast cancer progression, which could be a potential target for therapy.

**[Key words]** TUBA1C; breast cancer; microtubule; prognosis

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(11): 1530-1538]

**[基金项目]** 北京大医公益基金肿瘤学科能力建设项(DY-Tumor2022-J001);江苏省科技计划项目(BE2017626)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuchaoying666@163.com

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,在全球女性恶性肿瘤中发病率最高<sup>[1]</sup>。作为一种复杂的异质性疾病,乳腺癌在分子特征和恶性程度上显示出很大的差异性<sup>[2]</sup>。尽管近年来针对乳腺癌的治疗手段不断发展,包括外科手术、内分泌治疗、化疗、放疗和靶向疗法在内的综合手段已在很大程度上提高了疗效,但对晚期患者仍缺乏有效治疗手段<sup>[3-6]</sup>。因此,应进一步探究与乳腺癌发生、发展相关的功能基因,探索新的发病机制和治疗靶点。

细胞骨架,包括微管、微丝和中间丝,与增殖、迁移、侵袭等多种细胞生物学行为密切相关<sup>[7]</sup>。微管是真核细胞中普遍存在的纤维结构,在多种肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用。细胞中微管的形成与重塑在很大程度上由微管基因超家族介导<sup>[8-9]</sup>。此外,包括紫杉醇在内的多种微管靶向化疗药物已广泛用于乳腺癌等常见肿瘤的临床治疗<sup>[10]</sup>。鉴于微管基因超家族在乳腺癌中的重要作用,本研究对微管基因超家族成员的表达差异和预后价值进行系统分析,从而选定微管蛋白 $\alpha$ 家族1c蛋白(tubulin,  $\alpha$  1c, TUBA1C)作为研究对象。进一步通过免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色和细胞学实验,明确TUBA1C在乳腺癌中表达的临床意义及其生物学功能。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 癌症基因组图谱数据获取

从UCSC Xena(<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas, TCGA)乳腺癌RNA测序数据。基因表达采用 $\log_2(x+1)$ 标准化形式表示。共保留含有微管基因超家族表达数据的1 104个乳腺癌和114个正常样本。通过参考Nami等<sup>[8]</sup>的研究确定微管基因超家族的成员。

1.1.2 Kaplan-Meier plotter数据库

采用Kaplan-Meier plotter数据库(<http://kmplot.com>)分析微管基因超家族的预后价值<sup>[11]</sup>。选择每个基因的JetSet最佳探针表达量代表微管基因超家族的表达量(表1)。乳腺癌样本的基因表达中位水平作为生存分析的分组截点。在线计算风险比(hazard ratio, HR)、95%置信区间(confidence interval, CI)和P值。

1.1.3 Oncomine数据库

从Oncomine数据库(<https://www.oncomine.org/>)中获取各种恶性肿瘤中TUBA1C的mRNA表达数

表1 微管基因对应的探针

Table 1 Probes used for tubulin genes	
微管基因	最佳探针
TUBA1A	209118_s_at
TUBA1B	211058_x_at
TUBA1C	209251_x_at
TUBA3C	210527_x_at
TUBA3D	216323_x_at
TUBA4A	212242_at
TUBA4B	207490_at
TUBA8	220069_at
TUBAL3	220310_at
TUBB	204141_at
TUBB1	230690_at
TUBB2A	204141_at
TUBB2B	214023_x_at
TUBB3	202154_x_at
TUBB4A	212664_at
TUBB4B	213726_x_at
TUBB6	209191_at
TUBB8	N.A.
TUBD1	231853_at
TUBE1	226181_at
TUBG1	201714_at
TUBG2	203894_at
TUBGCP2	202477_s_at
TUBGCP3	203690_at
TUBGCP4	211337_s_at
TUBGCP5	227967_at
TUBGCP6	225758_s_at

据<sup>[12]</sup>。判断TUBA1C在癌与癌旁组织中是否显著差异表达的标准如下:P值为 $1\times 10^{-4}$ ,倍数变化为2,基因排名位于前10%。

1.1.4 组织芯片获取

两张乳腺癌组织芯片(tissue microarray, TMA)(HBreD140Su03和HBreD077Su01)购自上海芯超生物科技有限公司。HBreD140Su03芯片包含140个乳腺癌组织位点,HBreD077Su01芯片包含其中配对的77个癌旁组织位点。组织芯片的使用由上海芯超生物科技有限公司临床研究伦理委员会审批通过(审批编号:YBM-05-02)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

在两张TMA上进行IHC染色。过程如下:按常规方法进行脱蜡,水合,将切片用二甲苯浸泡5 min,更换二甲苯后再浸泡5 min。分别用无水乙醇浸泡

5 min, 95%乙醇浸泡 5 min, 85%乙醇浸泡 5 min, 70%乙醇中浸泡 5 min, PBS 浸洗 3 min×3 次。柠檬酸钠缓冲液抗原修复, 滴 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶, 1% BSA 工作液封闭, 滴加 TUBA1C 一抗 (1: 100 稀释, Abcam 公司, 美国)。4 ℃ 孵育过夜, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 滴加二抗, 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次。DAB 反应染色, 冲洗后苏木精复染, 干燥封片检测。在免疫组化染色过程中, 有 6 例癌组织芯点和 5 例癌旁组织芯点脱片。使用显微镜 (Olympus BX43) 对免疫染色的切片进行拍照。由两位高年资病理科医师采用 12 分制独立对每个组织位点进行半定量分析, 将染色阳性细胞百分比评为 0~4 分: 0 分 (<5%)、1 分 (6%~25%)、2 分 (>25%~50%)、3 分 (>50%~75%) 和 4 分 (>75%), 将染色强度评为 0~3 分: 0 分 (阴性)、1 分 (弱)、2 分 (中)、3 分 (强)。免疫反应性评分 (immunoreactivity score, IRS) 为阳性细胞的百分比评分和染色强度评分的乘积。

1.2.2 细胞培养和 siRNA 转染

MCF7 和 MDA-MB-231 细胞购自江苏凯基生物技术股份有限公司。MCF7 细胞培养条件为 90% RMPI-1640 培养基+10% FBS, MDA-MB-231 细胞培养条件为 90% L15 培养基+10% FBS, 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen 公司, 美国) 进行转染操作, 过程如下: 转染前 1 天, 接种适当数量的细胞至 6 孔板中, 使转染时的细胞密度为 50%~60%; 用 125 μL 不含血清的培养基 Opti-MEM 稀释 5 μL 20 μmol/L TUBA1C siRNA 及对照 siRNA (NC), 轻轻混匀, 室温孵育 5 min; 用 125 μL 不含血清的培养基 Opti-MEM 稀释 5 μL Lipofectamine 3000, 轻轻混匀并室温孵育 5 min; 将 siRNA 稀释液和 Lipofectamine 3000 稀释液轻轻混匀, 室温孵育 20 min; 将混合液加入含有细胞的 750 μL 完全培养基的培养孔中, 轻轻混匀, 置于 37 ℃ 的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h 用于后续操作。委托江苏凯基生物技术股份有限公司构建了 3 条靶向 TUBA1C 的 siRNA (表 2)。

1.2.3 实时定量 PCR 检测基因表达

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国) 提取各组乳腺癌细胞的总 RNA。mRNA 逆转录引物通过 Primer 6 软件设计, 用于基因扩增的引物 GAPDH: 5'-CAAATTC CATGGCACC GTCA-3' (正向), 5'-AGCATCGCCCCACTTGATTT-3' (反向); TUBA1C: 5'-GGGATGAGTGCTTTGTGTGC-3' (正向), 5'-GTGT-

表2 针对TUBA1C设计的siRNA序列

名称	序列(5'→3')
siRNA-1	GGGCAGUGUUUGUAGACUUTT AAGUCUACAAACACUGCCCTT
siRNA-2	AGGAAGAUGCUGCCAAUAATT UUAUUGGCAGCAUCUCCUTT
siRNA-3	CAGCUGUAGUUGAGCCCUATT UAGGGCUCAACUACAGCUGTT

TAAAAGGCGCAGGGAG-3' (反向)。使用 SYBR Green (One Step TB Green™PrimeScript™RT-PCR Kit II, TaKaRa 公司, 日本) 对扩增的基因进行标记, 反应 40 个循环。2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法用于 GAPDH 和 TUBA1C 表达量分析。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

使用全蛋白抽提试剂盒提取各组乳腺癌细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白加入 SDS-PAGE 上样孔, 电泳分离后电转移至 NC 膜; 采用 10% BSA 溶液封闭后用一抗 (1: 2 000 稀释, Abcam 公司, 美国) 4 ℃ 孵育过夜, TBST 清洗后加入 HRP 标记的二抗 4 ℃ 孵育 4 h; ECL 法显色后曝光并采集图片, 使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

1.2.5 细胞增殖 CCK-8 检测

转染前将乳腺癌细胞消化、计数、配制成浓度为 6×10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液, 在 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液; 将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 根据组别进行转染, 同时设立阴性对照组, 每组设置 3 个复孔; 转染后置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。之后以 24 h、48 h、72 h 作为时间节点每孔加入 10 μL CCK-8 溶液进行 CCK8 分析, 测定 450 nm 时的吸光度值。

1.2.6 流式细胞仪分析细胞凋亡

将对数生长期的细胞消化接种到 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 根据组别进行转染, 同时设立阴性对照组, 每组设置 3 个复孔; 转染 24 h 后, 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化收集细胞; PBS 洗涤细胞 2 次并离心 (1 000 r/min, 5 min) 收集约 5×10<sup>5</sup> 个细胞; 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-APC 并混匀, 再加入 5 μL 7-AAD 并混匀; 室温避光反应 10 min; 流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。

1.3 统计学方法

数据分析均采用 SPSS 26.0 软件。部分生物信息学分析和图像可视化采用 R 语言进行。计量资料在统计图中以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。计量资料



的两两比较采用独立样本  $t$  检验, TUBA1C 表达高低与临床病理参数的关系采用  $\chi^2$  检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 检验, 单、多因素 Cox 回归分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

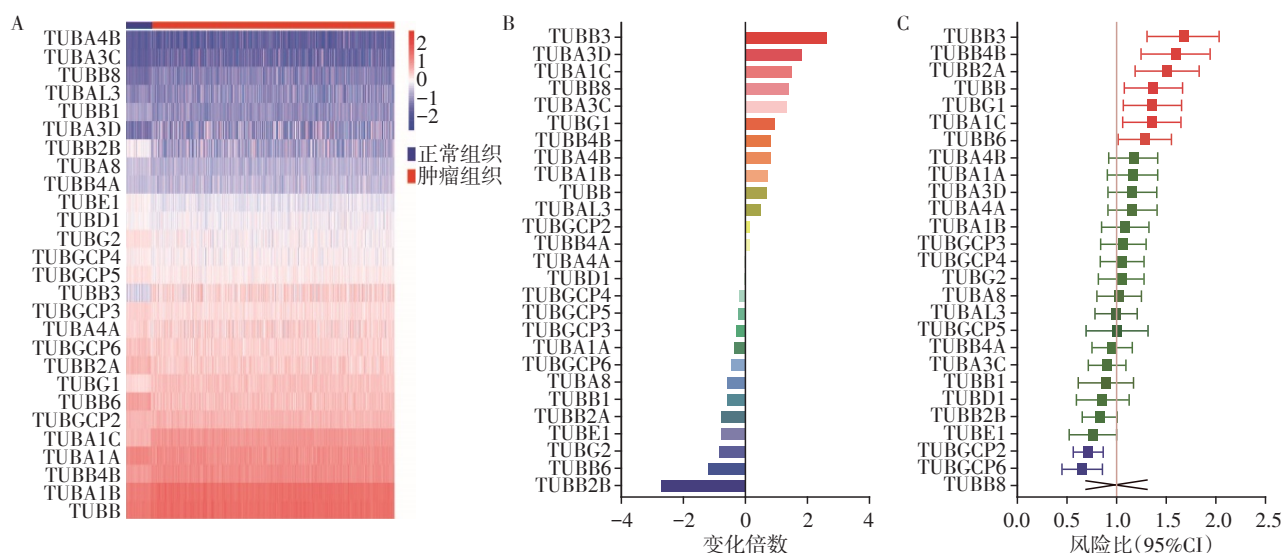
### 2.1 乳腺癌中微管基因超家族的表达和预后分析

基于TCGA和Kaplan-Meier plotter数据库的生物信息学分析表明,部分微管基因超家族成员在乳腺癌

中表达明显失调,其中TUBB3、TUBA3D、TUBA1C为上调最明显的3个成员,TUBB3B、TUBB6、TUBG2为下调最明显的3个成员(图1A、B)。微管基因超家族中,共9个成员和乳腺癌的预后密切相关,其中TUBB3、TUBBB4B、TUBB2A、TUBB、TUBG1、TUBA1C和TUBB6是预后危险因素,TUBGCP2和TUBGCP6是预后保护因素(图1C)。

### 2.2 微管蛋白TUBA1C在乳腺癌中的表达

选取同时满足表达丰度位于前10位、差异倍数



A:微管基因超家族在乳腺癌及癌旁组织中的表达差异热图;B:微管基因超家族在乳腺癌及癌旁组织中的差异表达倍数;C:微管基因超家族对乳腺癌预后的价值。

图1 乳腺癌中微管基因超家族的表达和预后分析

Figure 1 Expression level and prognostic value of microtubule gene superfamily in breast cancer

$\geq 1.5$  倍且预后价值显著的微管基因作为后续研究对象,其中TUBB6和TUBA1C满足条件(图2A)。进一步选取在乳腺癌中缺乏研究的TUBA1C作为研究对象,在Oncomine数据库中进行检索,结果表明,在大部分研究中TUBA1C在乳腺癌及其他恶性肿瘤组织中均呈表达上调趋势(表3)。IHC结果表明,TUBA1C在乳腺癌组织中的阳性率为68.66%,癌旁组织中阳性率为50.00%,两者相比差异有统计学意义( $\chi^2=6.929, P=0.008$ ,图2B,表4)。

### 2.3 微管蛋白TUBA1C表达与病理参数和预后的关系

$\chi^2$  检验结果表明, TUBA1C 表达状态与年龄( $\chi^2=1.004, P=0.316$ )、T 分期( $\chi^2=0.329, P=0.848$ )、N 分期( $\chi^2=1.712, P=0.634$ )、分化程度( $\chi^2=0.048, P=0.827$ )、雌激素受体状态( $\chi^2=0.114, P=0.735$ )、孕激素受体状态( $\chi^2=0.667, P=0.414$ )及HER2状态( $\chi^2=2.551, P=0.110$ )均无显著相关性,但与TNM分期( $\chi^2=$

6.357,  $P=0.042$ )和生存状态( $\chi^2=6.432, P=0.011$ )存在显著相关性(表5)。

Kaplan-Meier法分析表明, TUBA1C 高表达与乳腺癌患者较短的总生存期(overall survival, OS)显著相关( $P=0.021$ ),即乳腺癌组织中TUBA1C高表达的患者预后较低表达的患者更差(图3)。在总生存预后因素的单、多因素Cox回归模型中,年龄(单因素: $P=0.001$ ,多因素: $P < 0.001$ )和TUBA1C表达状态(单因素: $P=0.032$ ,多因素: $P=0.040$ )均是乳腺癌患者的独立预后因素(表6)。

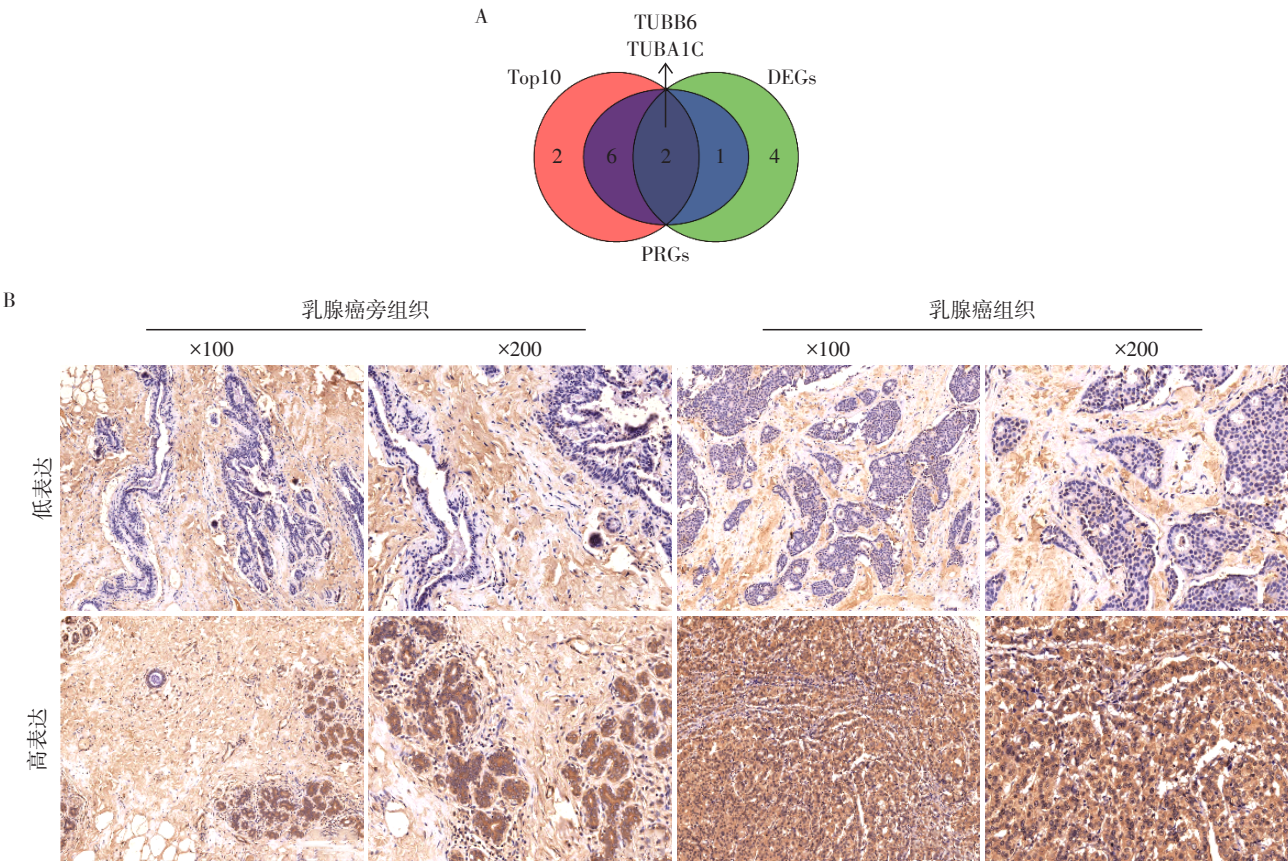
### 2.4 针对TUBA1C的siRNA筛选和沉默效率验证

选取MDA-MB-231和MCF-7乳腺癌细胞作为细胞实验载体,qPCR和Western blot结果表明,转染siRNA-2的细胞中,TUBA1C mRNA和蛋白呈现最大幅度下调(图4)。

### 2.5 敲低TUBA1C对乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响

采用CCK-8法检测细胞增殖能力。转染24 h、





A: 韦恩图显示同时满足表达丰度位于前 10 位、差异倍数 $\geq 1.5$  倍且预后价值显著的微管基因;B: 正常乳腺组织及乳腺癌组织中 TUBA1C 表达的代表图。

图2 关键微管基因选取及 TUBA1C 表达验证

Figure 2 Selection of key microtubule genes and validation of TUBA1C expression

表3 Oncomine数据库中乳腺癌与正常乳腺组织中TUBA1C mRNA 的表达水平

Table 3 TUBA1C expression in mRNA level between breast cancer tissues and normal tissues in Oncomine database

组别	病例数	变化倍数	t检验值	P值
导管原位癌 vs. 正常乳腺组织	11 vs. 14	2.129	6.525	<0.001
侵袭性导管癌 vs. 正常乳腺组织	9 vs. 14	2.036	5.699	<0.001
侵袭性癌 vs. 正常乳腺组织	76 vs. 61	2.588	14.142	<0.001
侵袭性导管/小叶癌 vs. 正常乳腺组织	3 vs. 61	2.027	12.477	<0.001
侵袭性导管癌 vs. 正常乳腺组织	389 vs. 61	2.655	18.275	<0.001
黏液性癌 vs. 正常乳腺组织	4 vs. 61	2.776	5.532	0.004
导管原位癌 vs. 正常乳腺组织	10 vs. 144	2.013	6.943	<0.001
良性乳腺肿瘤 vs. 正常乳腺组织	3 vs. 144	2.129	5.335	0.015
侵袭性癌 vs. 正常乳腺组织	53 vs. 6	-23.962	23.978	<0.001

48 h、72 h后两株乳腺癌细胞增殖变化结果如图5所示。转染操作本身在一定程度上影响了细胞增殖,但相对转染 siRNA-NC 组的细胞,转染 siRNA-2 的乳腺癌细胞增殖能力受到显著抑制。进一步采用流式细胞分析比较敲低 TUBA1C 对细胞凋亡的影响。类似的,转染操作本身在一定程度上诱导了细胞凋亡,但相对于转染 siRNA-NC 组的细胞,转染 siRNA-2

的乳腺癌细胞凋亡率显著增加(MDA-MB-231:  $P=0.001$ , MCF-7:  $P<0.001$ , 图6)。

3 讨 论

微管基因超家族是一个成员数量众多的基因家族,共有 6 个亚家族。除了构成微管蛋白二聚体的 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白家族外,微管基因超

表4 乳腺癌组织和癌旁组织中TUBA1C表达比较  
Table 4 Comparison of TUBA1C expression in breast cancer and paracancerous tissue

分组	病例数	TUBA1C表达[n(%)]	
		低表达	高表达
乳腺癌组织	134	42(31.34)	92(68.66)
癌旁组织	72	36(50.00)	36(50.00)

$\chi^2=6.929, P=0.008$ 。免疫组化评分 $\leq 4$ 分为低表达, $>4$ 分为高表达。

表5 TUBA1C表达水平和乳腺癌病理参数的关系  
Table 5 Association between TUBA1C expression and clinical features in breast cancer [n(%)]

临床病理参数	病例数	TUBA1C表达		$\chi^2$ 值	P值
		低表达	高表达		
年龄				1.004	0.316
≤60岁	94	27(28.72)	67(71.28)		
>60岁	40	15(37.50)	25(62.50)		
T分期				0.329	0.848
T1	55	17(30.91)	38(69.09)		
T2	77	24(31.17)	53(68.83)		
T3	2	1(50.00)	1(50.00)		
N分期				1.712	0.634
N0	72	24(33.33)	48(66.67)		
N1	19	7(36.84)	12(63.16)		
N2	35	8(22.86)	27(77.14)		
N3	8	3(37.50)	5(62.50)		
TNM分期				6.357	0.042
1	32	6(18.75)	26(81.25)		
2	59	25(42.37)	34(57.63)		
3	43	11(25.58)	32(74.42)		
分化程度				0.048	0.827
高分化	94	30(31.91)	64(68.09)		
低分化	40	12(30.00)	28(70.00)		
雌激素受体状态				0.114	0.735
阴性	45	13(28.89)	32(71.11)		
阳性	85	27(31.76)	58(68.24)		
未知	4	—	—		
孕激素受体状态				0.667	0.414
阴性	66	18(27.27)	48(72.73)		
阳性	65	22(33.85)	43(66.15)		
未知	3	—	—		
HER2状态				2.551	0.110
阴性	99	33(33.33)	66(66.67)		
阳性	24	4(16.67)	20(83.33)		
未知	11	—	—		
生存状态				6.432	0.011
生存	107	39(36.45)	68(63.55)		
死亡	27	3(11.11)	24(88.89)		

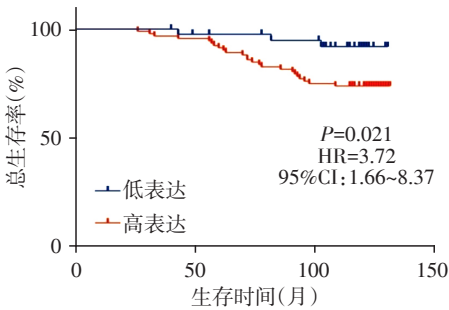


图3 乳腺癌组织TUBA1C表达与预后的关系  
Figure 3 Association between TUBA1C expression and prognosis

家族还包括 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\eta$ 家族<sup>[8]</sup>。 $\gamma$ -微管蛋白在中心体微管装配的成核过程中起关键作用<sup>[13]</sup>。微管家族其他成员的作用仍有待进一步阐明。因此,本研究使用TCGA和Kaplan-Meier plotter数据系统分析乳腺癌中微管基因超家族表达水平和预后价值。结果发现部分微管基因表达水平失调,且具有明显的预测预后的价值,通过设定的标准进一步选取TUBA1C作为候选对象进行深入研究。

TUBA1C是 $\alpha$ -微管蛋白的一种亚型,是一种多功能的细胞骨架蛋白,与微管结构的组织有关,参与调控诸多关键的细胞行为,对细胞分裂过程至关重要<sup>[14-15]</sup>。既往研究表明,TUBA1C在胰腺癌、肝癌等多种恶性肿瘤中均上调,而敲低TUBA1C表达可显著抑制肿瘤的生长和进展<sup>[15-17]</sup>。此外,最近研究表明,敲除 $\beta$ -微管蛋白可增强长春碱抑制有丝分裂和诱导细胞凋亡的能力<sup>[18]</sup>。但是目前尚无TUBA1C在乳腺癌中表达及作用的相关研究报道。

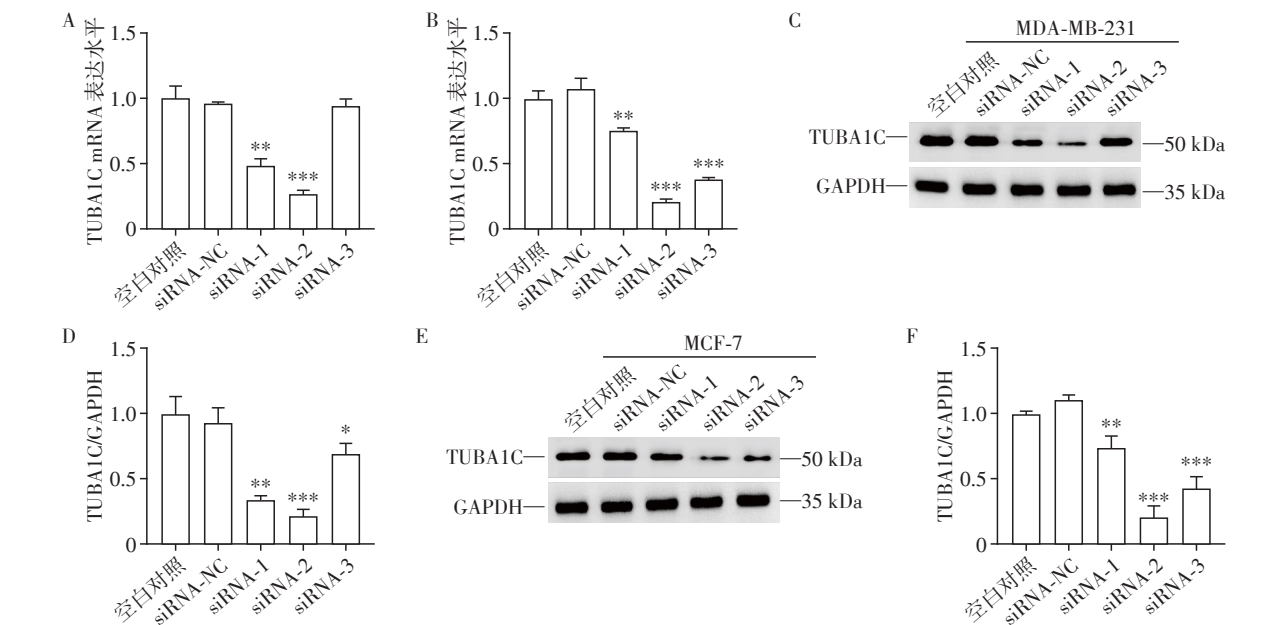
基于以上内容,本研究推测TUBA1C可能同样在乳腺癌中起到癌基因的作用。首先,Oncomine数据库和IHC分析证实,乳腺癌组织中TUBA1C表达量显著高于癌旁正常乳腺组织。TUBA1C高表达与较高的临床分期和较差的预后显著相关。此外,单因素和多因素回归分析表明,TUBA1C上调是乳腺癌患者预后的独立危险因素。此前,Wang等<sup>[19]</sup>通过生物信息学分析发现TUBA1C是乳腺癌的预后相关基因,这与本研究结论一致。

本研究进一步通过细胞学实验研究TUBA1C在乳腺癌细胞中的功能。对两株常用的乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7进行转染,结果发现转染靶向TUBA1C的siRNA后,两株乳腺癌细胞的增殖能力受到了明显抑制,同时凋亡率明显上升。本研究的发现与先前在肝癌和胰腺癌中的研究结果一致,即敲低TUBA1C抑制肿瘤细胞增殖并诱导凋亡,从

表6 乳腺癌患者生存因素的单、多因素分析

Table 6 Univariate and multivariate analysis of survival factors in patients with breast cancer

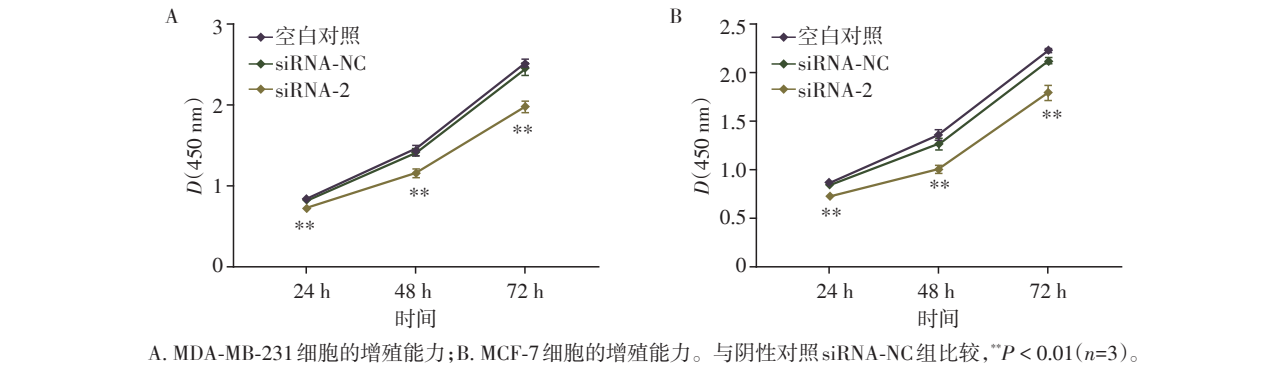
临床病理参数	单因素分析			多因素分析		
	风险比	95%CI	P值	风险比	95%CI	P值
年龄	1.05	1.02~1.09	0.001	1.07	1.04~1.11	<0.001
T分期	1.30	0.62~2.71	0.491	—	—	—
N分期	1.78	1.25~2.54	0.002	2.10	0.95~4.63	0.068
TNM分期	2.22	1.25~3.92	0.006	0.98	0.31~3.09	0.979
分化程度	1.85	0.86~3.98	0.117	—	—	—
TUBA1C	3.72	1.12~12.37	0.032	3.53	1.06~11.76	0.040



A: MDA-MB-231 细胞的 TUBA1C mRNA 表达水平; B: MCF-7 细胞的 TUBA1C mRNA 表达水平; C、D: MDA-MB-231 细胞的 TUBA1C 蛋白表达水平 (C) 和定量分析 (D); E、F: MCF-7 细胞的 TUBA1C 蛋白表达水平 (E) 和定量分析 (F)。与空白对照和阴性对照 siRNA-NC 组比较, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 (*n* = 3)。

图4 siRNA 沉默 TUBA1C 基因的效率验证

Figure 4 Validation of siRNA silencing efficiency of TUBA1C gene



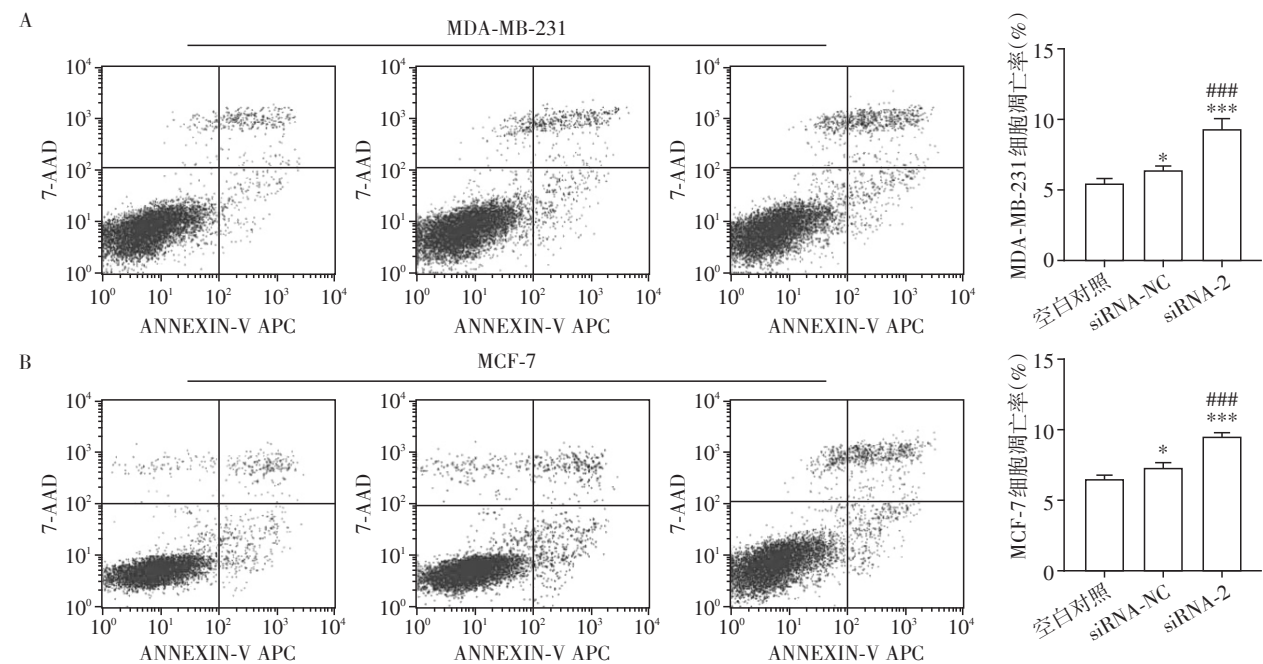
A. MDA-MB-231 细胞的增殖能力; B. MCF-7 细胞的增殖能力。与阴性对照 siRNA-NC 组比较, \*\**P* < 0.01 (*n* = 3)。

图5 转染 siRNA 后乳腺癌细胞增殖能力比较

Figure 5 Comparison of proliferation of breast cancer cells transfected with siRNA

而抑制肿瘤的进展<sup>[15-16]</sup>。机制方面,生物信息学分析提示 TUBA1C 对细胞周期、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂、蛋白酶体、DNA 复制、p53 信号转导等多条通路有潜在调控关系<sup>[15]</sup>。此外,最新研究表明, TUBA1C 是长链非编码 RNA RP11-480112.5 的亲本基因,而后者通过上调 AKT3 和





A. MDA-MB-231 细胞的凋亡水平;B. MCF-7 细胞的凋亡水平。与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与 siRNA-NC 组比较,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ ( $n=3$ )。

图6 转染siRNA后乳腺癌细胞凋亡水平比较  
Figure 6 Comparison of apoptosis of breast cancer cells transfected with siRNA

CDK6促进乳腺癌的恶性进展<sup>[20]</sup>。

综上所述,通过对微管基因超家族进行系统分析和验证,本研究发现乳腺癌组织中TUBA1C的水平明显上调,且与乳腺癌的进展和不良预后密切相关。此外,敲低TUBA1C表达可以抑制乳腺癌细胞增殖并诱导其凋亡。因此TUBA1C可作为乳腺癌中潜在的诊断和预后标志物及治疗靶点。

【参考文献】

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA A Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33

[2] PROVENZANO E, ULANER G A, CHIN S F. Molecular classification of breast cancer [J]. PET Clin, 2018, 13(3): 325-338

[3] PAGE D B, BEAR H, PRABHAKARAN S, et al. Two may be better than one: PD-1/PD-L1 blockade combination approaches in metastatic breast cancer[J]. NPJ Breast Cancer, 2019, 5: 34

[4] ESTEVA F J, HUBBARD-LUCEY V M, TANG J, et al. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer [J]. Lancet Oncol, 2019, 20(3): e175-e186

[5] YU L Y, TANG J, ZHANG C M, et al. New immunotherapy strategies in breast cancer[J]. Int J Environ Res Pub-

lic Health, 2017, 14(1): 68

[6] 张岭,王珏,陈锐,等. 紫杉醇与白蛋白结合型紫杉醇在HER2阴性乳腺癌新辅助化疗中的疗效研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(6): 807-811

[7] MOUJABER O, STOCHAJ U. The cytoskeleton as regulator of cell signaling pathways [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(2): 96-107

[8] NAMI B, WANG Z. Genetics and expression profile of the tubulin gene superfamily in breast cancer subtypes and its relation to taxane resistance [J]. Cancers (Basel), 2018, 10(8): 274

[9] BINAROVA P, TUSZYNSKI J. Tubulin: structure, functions and roles in disease[J]. Cells, 2019, 8(10): 1294

[10] ČERMÁK V, DOSTÁL V, JELÍNEK M, et al. Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment [J]. Eur J Cell Biol, 2020, 99(4): 151075

[11] NAGY Á, LÁNCZKY A, MENYHÁRT O, et al. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9227

[12] RHODES D R, YU J, SHANKER K, et al. Oncomine: a cancer microarray database and integrated data-mining platform[J]. Neoplasia, 2004, 6(1): 1-6

[13] TOVEY C A, CONDUIT P T. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes and beyond [J]. Essays Bio-

- chem, 2018, 62(6):765-780
- [14] JORDAN M A, WILSON L. Microtubules as a target for anticancer drugs[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(4):253-265
- [15] ALBAHDE M A H, ZHANG P, ZHANG Q, et al. Upregulated expression of TUBA1C predicts poor prognosis and promotes oncogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma via regulating the cell cycle[J]. Front Oncol, 2020, 10: 49
- [16] WANG J, CHEN W, WEI W W, et al. Oncogene TUBA1C promotes migration and proliferation in hepatocellular carcinoma and predicts a poor prognosis [J]. Oncotarget, 2017, 8(56):96215-96224
- [17] LI H, JIANG X M, ZHU S J, et al. Identification of personalized dysregulated pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(4):327-332
- [18] SHARBEEN G, MCCARROLL J, LIU J, et al. Delineating the role of beta IV-tubulins in pancreatic cancer: beta IVb-tubulin inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to vinca alkaloids[J]. Neoplasia, 2016, 18(12):753-764
- [19] WANG C C N, LI C Y, CAI J H, et al. Identification of prognostic candidate genes in breast cancer by integrated bioinformatic analysis[J]. J Clin Med, 2019, 8(8):1060
- [20] LOU W, DING B, ZHONG G, et al. RP11-480I12.5-004 promotes growth and tumorigenesis of breast cancer by relieving miR-29c-3p-mediated AKT3 and CDK6 degradation[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 21:916-931
- [收稿日期] 2021-10-05  
(本文编辑:陈汐敏)

(上接第1529页)

- H9c2 cells[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:103
- [18] KIM E H, PARK P H. Globular adiponectin protects rat hepatocytes against acetaminophen-induced cell death via modulation of the inflammasome activation and ER stress: critical role of autophagy induction [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 154:278-292
- [19] ZHU Q Q, LI H B, XIE X, et al. Adiponectin facilitates postconditioning cardioprotection through both AMPK-dependent nuclear and AMPK-independent mitochondrial STAT3 activation[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2020, 2020:4253457
- [20] WANG W J, DING W X, HUANG H P, et al. The role of mitophagy in the mechanism of genioglossal dysfunction caused by chronic intermittent hypoxia and the protective effect of adiponectin[J]. Sleep Breath, 2021, 25(2):931-940
- [21] BANG S, WON K H, MOON H R, et al. Novel regulation of melanogenesis by adiponectin via the AMPK/CRTC pathway[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2017, 30(6):553-557
- [22] KIM Y, CHO J Y, OH S W, et al. Globular adiponectin acts as a melanogenic signal in human epidermal melanocytes[J]. Br J Dermatol, 2018, 179(3):689-701
- [23] BURKUS J, NAVARRETE SANTOS A, SCHINDLER M, et al. Adiponectin stimulates glucose uptake in mouse blastocysts and embryonic carcinoma cells [J]. Reprod Camb Engl, 2020, 159(3):227-239
- [收稿日期] 2022-03-23  
(本文编辑:陈汐敏)