

网络出版时间:2025-05-12 16:34:01 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250509.1629.006

◇肿瘤侵袭转移研究专题◇

论 著

信号蛋白 6D 通过 AURKA 抑制三阴性乳腺癌的恶性进展

周静妮¹, 赵荣荣¹, 罗文武¹, 王 弦², 郭欠影¹, 吴正升^{1,3}

(¹ 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022; ² 安徽医科大学第二附属医院病理科, 合肥 230601; ³ 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032)

摘要 **目的** 探讨信号蛋白 6D (SEMA6D) 在三阴性乳腺癌 (TNBC) 恶性进展中的作用。**方法** 通过生物信息学和免疫组化分析 SEMA6D 在 TNBC 和癌旁非肿瘤组织中的表达水平及其与患者临床病理特征的关系; 构建稳定敲低 SEMA6D 表达的 MDA-MB-231 细胞系进行体外实验, 通过细胞划痕和 Transwell 实验研究 SEMA6D 对 TNBC 细胞的迁移和侵袭的影响; cBioPortal 数据库和 GEPIA2 数据库筛选出与其负相关的基因, 即极光激酶 A (aurora kinase A, AURKA), 生物信息学和免疫组化分析 AURKA 在 TNBC 和癌旁非肿瘤组织中的表达水平及其与患者临床病理特征的关系; Western blot 实验分析敲低 SEMA6D 后 AURKA 的表达和上皮间质转化相关标志物蛋白紧密连接蛋白-1 (Claudin-1)、钙黏蛋白 N (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达的影响。**结果** 生物信息学分析和免疫组化结果显示, SEMA6D 在 TNBC 组织中的表达低于癌旁非肿瘤组织 (均 $P < 0.05$), AURKA 在 TNBC 组织中的表达高于癌旁非肿瘤组织 (均 $P < 0.05$), SEMA6D 和 AURKA 在 TNBC 中表达呈负相关 ($P < 0.01$); SEMA6D 低表达和 AURKA 高表达均与 TNBC 患者肿瘤大小、肿瘤组织学分级、临床分期和淋巴结转移呈正相关 (均 $P < 0.05$); 敲低 SEMA6D 促进 TNBC 细胞的迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.001$); Western blot 结果显示, 敲低 SEMA6D 后 AURKA 表达上调并且促进肿瘤细胞 N-cadherin 和 Vimentin 的表达, 抑制了 Claudin-1 的表达。**结论** TNBC 中 SEMA6D 表达下调, 可能通过上调 AURKA 的表达以及促进上皮间质转化, 参与 TNBC 的恶性进展。

关键词 三阴性乳腺癌; 信号蛋白 6D; AURKA; 迁移; 侵袭; EMT

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)05-0788-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.004

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 中国乳腺癌的发病率和死亡率均居女性恶性肿瘤的首位^[1]。三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是乳腺癌的一种特殊亚型, 约占所有乳腺癌的 15%~20%, 由于缺乏雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的表达, TNBC 具有高度侵袭性, 表现为复发率高、转移潜力大、总生存期短^[2], 并且对内分泌治疗和 HER2 靶向治疗不敏感, 缺乏针对性治疗方案, 因此寻求新的治疗靶点至关重要。

信号蛋白 6D (semaphorin 6D, SEMA6D) 是一种

膜结合型蛋白, 最初在神经系统中发挥作用, 进一步研究^[3]表明通过调控细胞增殖、细胞存活、细胞黏附和迁移、免疫反应调控和血管生成参与组织稳态和肿瘤发生。极光激酶 A (aurora kinase a, AURKA) 是丝/苏氨酸激酶家族的一员, 在有丝分裂中起主要作用, 是一种致癌基因, 在多种类型的癌症中过表达或基因扩增。研究^[4]表明, AURKA 在 TNBC 中起促肿瘤作用。目前 SEMA6D 在 TNBC 中的作用及其与 AURKA 的关系尚不明确。因此该研究旨在探讨 SEMA6D 对 TNBC 生物学行为的影响及其与 AURKA 表达的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人 TNBC 细胞系 MDA-MB-231、人肾上皮细胞 HEK293T 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 临床样本 本研究收集的 82 例 TNBC 组织和 48 例癌旁非肿瘤组织样本均来自安徽医科大学第一附属医院 2019 年 5 月—2024 年 3 月间接受手

2025-01-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82473059); 安徽医科大学
校科研基金项目 (编号: 2022xkj190)

作者简介: 周静妮, 女, 硕士研究生;

吴正升, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail:

wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

术的患者标本,术后病理和免疫组化诊断为 TNBC。组织离体后对肿瘤组织和癌旁组织(距肿瘤边缘 > 2 cm)分别进行取材,放入 4% 甲醛溶液进行固定,取材和脱水后制备石蜡包埋组织和组织切片。所有样本使用均获得患者知情同意,本实验已通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(批准号:2024284)。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清(南京维森特生物技术有限公司,货号:087-150);DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、DMEM/F12 培养基、PBS(苏州赛默飞世尔仪器有限公司,货号:11966025、11875176、11320033、10010023);蛋白裂解液 RIPA(上海碧云天技术有限公司,货号:P0013C);通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:PV-9000);兔抗人 SEMA6D(北京傲锐东源生物科技有限公司,货号:TA351645);兔抗人 AURKA、鼠抗人 GAPDH、紧密连接蛋白 1(Claudin-1)、钙黏蛋白 N(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)(武汉三鹰公司,货号:10297-1-AP、60004-1-Ig、28674-1-AP、22018-1-AP、10366-1-AP)。

1.1.4 主要耗材及仪器 Transwell 小室(美国 Corning 公司,货号:3491)、细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司,型号:JIMBIO FIL)、低速离心机(湖南湘立科学仪器有限公司,型号:TDZ5-WS)、台式微量离心机(美国 beckman coulter 公司,型号:Microfuge 16)、恒温振荡器(上海力辰仪器科技有限公司,型号:ZD-85)、脱色摇床(上海智城分析仪器制造有限公司,型号:ZHWY-344)。

1.2 方法

1.2.1 公共数据库分析 通过 GEO 数据库(GSE38959)分析 TNBC 和癌旁非肿瘤组织差异表达基因,筛选条件: $|\log_2 FC| > 1$,且 $P < 0.05$,共筛选出上调基因 35 个,下调基因 24 个。利用在线数据库 UALCAN 进一步分析 SEMA6D 在 TNBC 和正常乳腺组织中的表达水平;基于公共数据库 cBioPortal 和 GEPIA2 数据库筛选出与 SEMA6D 负相关的基因,得到目的基因 AURKA,利用在线数据库 UALCAN 进一步分析 AURKA 在 TNBC 和正常乳腺组织中的表达水平。

1.2.2 免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 将石蜡包埋的 TNBC 和癌旁非肿瘤组织进行连续 4 μm 切片,切片放置 95 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤 30 min,然后放入 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烤片 2 h,采用 Envision 两步法检测 SEMA6D 和 AURKA 在 TNBC 和癌旁非肿瘤组织中

的蛋白表达水平。经脱蜡水化、柠檬酸盐高压修复、过氧化氢阻断、SEMA6D(1:50)及 AURKA(1:100)抗体过夜孵育、复温后标抗鼠/兔 IgG 聚合物(急用型)室温孵育 15~30 min、DAB 显色、苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。结果判读:SEMA6D 蛋白和 AURKA 蛋白均位于细胞质,细胞质中出现棕色颗粒染色即为阳性,由两位病理医师采用双盲法阅片,每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$),根据半定量评分系统进行评分,免疫组化切片组织中的细胞按染色强度分级,与背景着色对比:无着色为 0 分,淡黄为 1 分,黄或深黄为 2 分;阳性细胞计数:1%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,76%~100% 为 4 分,两者相乘计算总分,1~2 分为低表达,3~8 分为高表达^[5]。

1.2.3 细胞培养 人 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 和人胚肾细胞 293T 在含有 10% 胎牛血清,1% 的青-链霉素双抗溶液的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱。

1.2.4 构建稳转细胞系 shSEMA6D 序列如下,shSEMA6D-1:5'-CTGGCAGGGATCAAGTTTATA-3';shSEMA6D-2:5'-TGGCCAGCGATGCCGTTATTT-3'。将 11.25 μg 目的质粒、3.75 μg pMD2G、7.5 μg ps-PAX2,混合均匀后加入 330 μl 0.1 $\times$ TE 溶液,56.5 μl 氯化钙溶液,加无菌水至 570 μl ;再缓慢逐滴加入 570 μl HBS 溶液,室温静置 15 min;最后将混合液缓慢逐滴加入 293 T 细胞并摇匀。收集病毒上清液并使用 0.22 μm 滤膜过滤后感染 MDA-MB-231 细胞,接着加入嘌呤霉素筛选表达目的质粒的稳转细胞系。最后收集上述稳转细胞,采用蛋白质印迹(Western blot, WB)实验对转染效率进行检测,构建成功后用于后续实验。

1.2.5 WB 实验 用裂解液分别提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度后用上样缓冲液定量,进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,恒流 225 mA 的条件下转膜 90 min,再使用 1 $\times$ 快速封闭液室温封闭 20 min,一抗 GAPDH(1:5 000)、SEMA6D、AURKA、Claudin-1、N-cadherin、Vimentin(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日使用 TBST 溶液洗膜 3 次(10 min/次)后,二抗(鼠、兔二抗均按 1:10 000 在 TBST 中稀释)室温孵育 1 h, TBST 溶液洗膜 3 次(5 min/次)后使用 ECL 显影液显影。

1.2.6 细胞划痕实验 在 6 孔板中铺 4×10^5 个 TNBC 细胞,镜下观察细胞至均匀分布满培养皿底部但不重叠的程度,用 10 μl 吸头在孔中划出一条直线,更换为无血清培养基培养,并找合适的位置拍

照记录,24 h 后再次在同样位置拍照,计算划痕宽度变化。

1.2.7 Transwell 实验 使用 Transwell 小室进行细胞迁移和侵袭检测。取对数生长的 TNBC 细胞,用无血清培养基将细胞以 5×10^4 个/ml 的浓度重悬,取 200 μ l 加入上室中,并用 10% 血清培养基 800 μ l 填充下室,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,将小室取出,用 4% 多聚甲醛固定液固定细胞 30 min 后,用 0.1% 结晶紫染液染色 1 h,用棉签轻柔擦去上室中的细胞,在显微镜下观察统计并拍照。侵袭实验时则在小室膜上提前匀布基质胶并等其凝固,后续步骤同迁移实验。

1.2.8 统计学处理 使用 Prism9 软件进行统计学分析,所有实验均独立重复 3 次,统计结果使用均数 $\pm$ 标准差表示。两组间数据比较使用 Student's *t* 检验进行分析,多组间比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析,事后组间的两两比较采用 Tukey 检验,两组间构成比的比较采用卡方检验进行分析,相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SEMA6D 在 TNBC 中的表达水平及其与临床

病理特征的关系 通过对 GEO 数据库(GSE38959)分析 TNBC 和正常乳腺组织的差异表达基因,得到上调基因 35 个,下调基因 24 个,进一步绘制热图,得到目的基因 *SEMA6D*,该基因在 TNBC 组织中表达下调(图 1A)。UALCAN 数据库显示,*SEMA6D* mRNA 在 TNBC 中的表达水平低于正常乳腺组织($t = 2.63, P < 0.05$,图 1B)。通过 IHC 检测 *SEMA6D* 在 TNBC 和癌旁非肿瘤组织中的表达水平及定位,结果显示:*SEMA6D* 主要定位于细胞质,在 TNBC 组织中低表达水平占比明显高于癌旁非肿瘤组织($P < 0.01$,图 1C、表 1);进一步分析 *SEMA6D* 表达与患者临床病理参数关系,结果显示:*SEMA6D* 低表达患者肿瘤大小、肿瘤组织学分级、临床分期和淋巴结转移更高(均 $P < 0.05$,表 2)。

表 1 SEMA6D 蛋白在 TNBC 组织和癌旁非肿瘤组织中的表达 [n(%)]

Tab. 1 The expression of SEMA6D protein in TNBC tissues and paracancer non-tumor tissues [n(%)]

Sample	SEMA6D		χ^2 value	<i>P</i> value
	High	Low		
TNBC	25 (30.5)	57 (69.5)	12.71	<0.01
Paracancer non-tumor tissues	30 (62.5)	18 (37.5)		

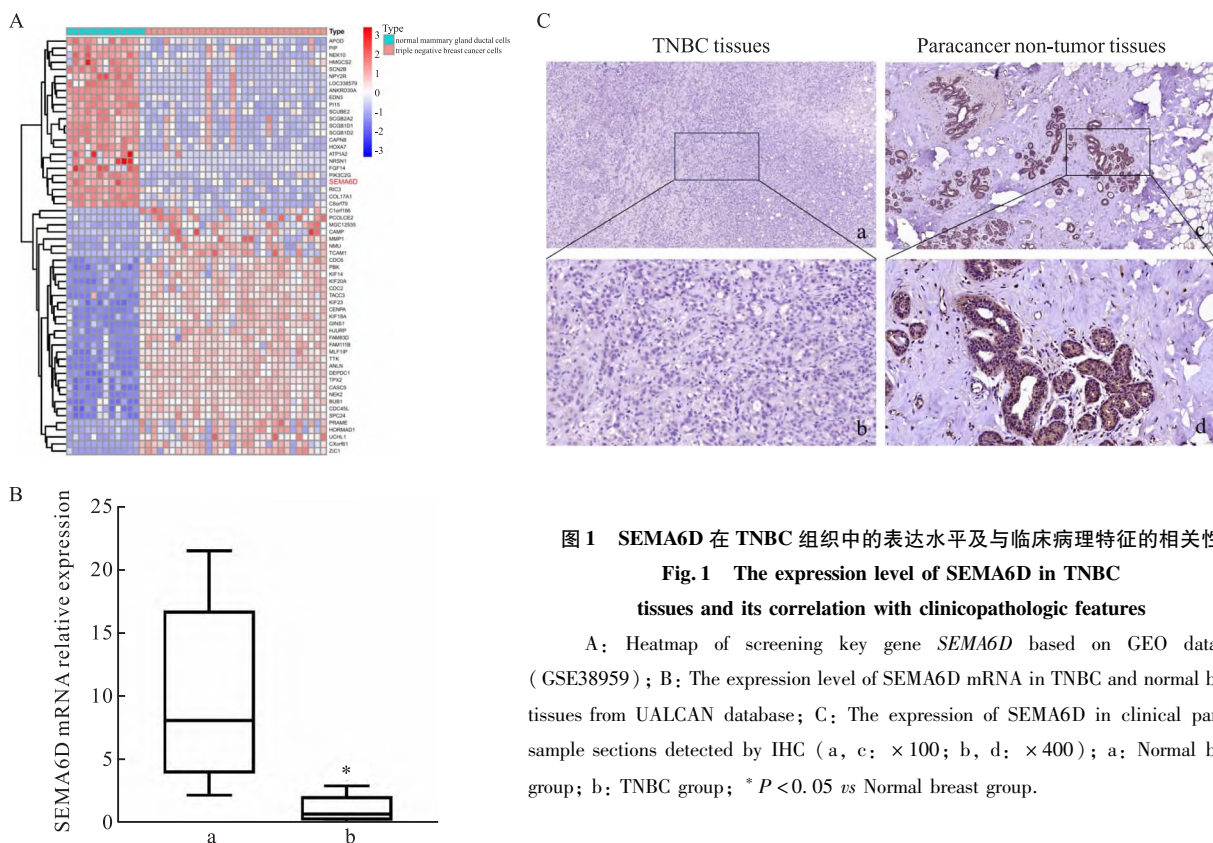


图 1 SEMA6D 在 TNBC 组织中的表达水平及与临床病理特征的相关性

Fig. 1 The expression level of SEMA6D in TNBC tissues and its correlation with clinicopathologic features

A: Heatmap of screening key gene *SEMA6D* based on GEO database (GSE38959); B: The expression level of *SEMA6D* mRNA in TNBC and normal breast tissues from UALCAN database; C: The expression of *SEMA6D* in clinical paraffin sample sections detected by IHC (a, c: $\times 100$; b, d: $\times 400$); a: Normal breast group; b: TNBC group; * $P < 0.05$ vs Normal breast group.

表2 SEMA6D 蛋白与 TNBC 患者

临床病理特征的关系[$n(\%)$]Tab.2 Relationship between SEMA6D protein and clinicopathologic features of TNBC patients [$n(\%)$]

Characteristic	SEMA6D		χ^2 value	P value
	High	Low		
Age (years)			3.719	0.156
<35	1 (4.0)	5 (8.8)		
35-55	18 (72.0)	28 (49.1)		
>55	6 (24.0)	24 (42.1)		
Tumor size (cm)			7.535	0.006
≤ 2	15 (60.0)	16 (28.1)		
>2	10 (40.0)	41 (71.9)		
Menopausal state			0.284	0.584
Premenopausal	13 (52.0)	26 (45.6)		
Postmenopausal	12 (48.0)	31 (54.4)		
Grade			5.924	0.015
I + II	13 (52.0)	14 (24.6)		
III	12 (48.0)	43 (75.4)		
Stage			6.839	0.009
I	13 (52.0)	13 (22.8)		
II + III	12 (48.0)	44 (77.2)		
Lymph node metastasis			4.181	0.041
No	24 (96.0)	42 (73.7)		
Yes	1 (4.0)	15 (26.3)		
Ki67			0.091	0.955
<25%	3 (12.0)	6 (10.5)		
25%-50%	8 (32.0)	20 (35.1)		
>50%	14 (56.0)	31 (54.4)		

2.2 敲低 SEMA6D 对 TNBC 细胞迁移和侵袭的影响 为探索 SEMA6D 对 TNBC 生物学行为的影响,使用 MDA-MB-231 细胞进行敲低稳转细胞系的构建,并进行 WB 实验验证效率,结果显示:SEMA6D 敲低组的 SEMA6D 蛋白表达水平明显低于对照组($t = 27.71$ 、 18.14 , 均 $P < 0.001$),表明敲低稳转细胞系构建成功(图 2A);细胞划痕试验结果显示:敲低 SEMA6D 之后,细胞划痕愈合速度明显快于对照组($t = 9.673$ 、 9.661 , 均 $P < 0.001$,图 2B);Transwell 实验结果显示:SEMA6D 敲低的 MDA-MB-231 细胞迁移能力($t = 28.43$ 、 34.28 , 均 $P < 0.001$,图 2C)和侵袭能力($t = 17.52$ 、 12.95 , 均 $P < 0.001$,图 2D)均明显增强。

2.3 AURKA 在 TNBC 组织中的表达水平及其与临床病理特征的关系 利用公开数据库分析与 SEMA6D 负相关的基因,得到目的基因为 AURKA($P < 0.001$,图 3A),随后 UALCAN 数据库显示 AURKA mRNA 在 TNBC 中的表达水平高于正常乳腺组织($t = 2.622$, $P < 0.05$,图 3B);通过 IHC 检测 AURKA

在 TNBC 和癌旁非肿瘤组织中的表达及定位,结果显示:AURKA 主要定位于细胞质,在 TNBC 组织中表达水平高于癌旁非肿瘤组织($P < 0.05$,图 3C,表 3);进一步分析 TNBC 的临床病理参数,结果显示:AURKA 高表达患者肿瘤大小、肿瘤组织学分级、临床分期和淋巴结转移更高(均 $P < 0.05$,表 4)。

表3 AURKA 蛋白在 TNBC 组织和

癌旁非肿瘤组织中的表达[$n(\%)$]Tab.3 The expression of AURKA protein in TNBC tissues and paracancer non-tumor tissues [$n(\%)$]

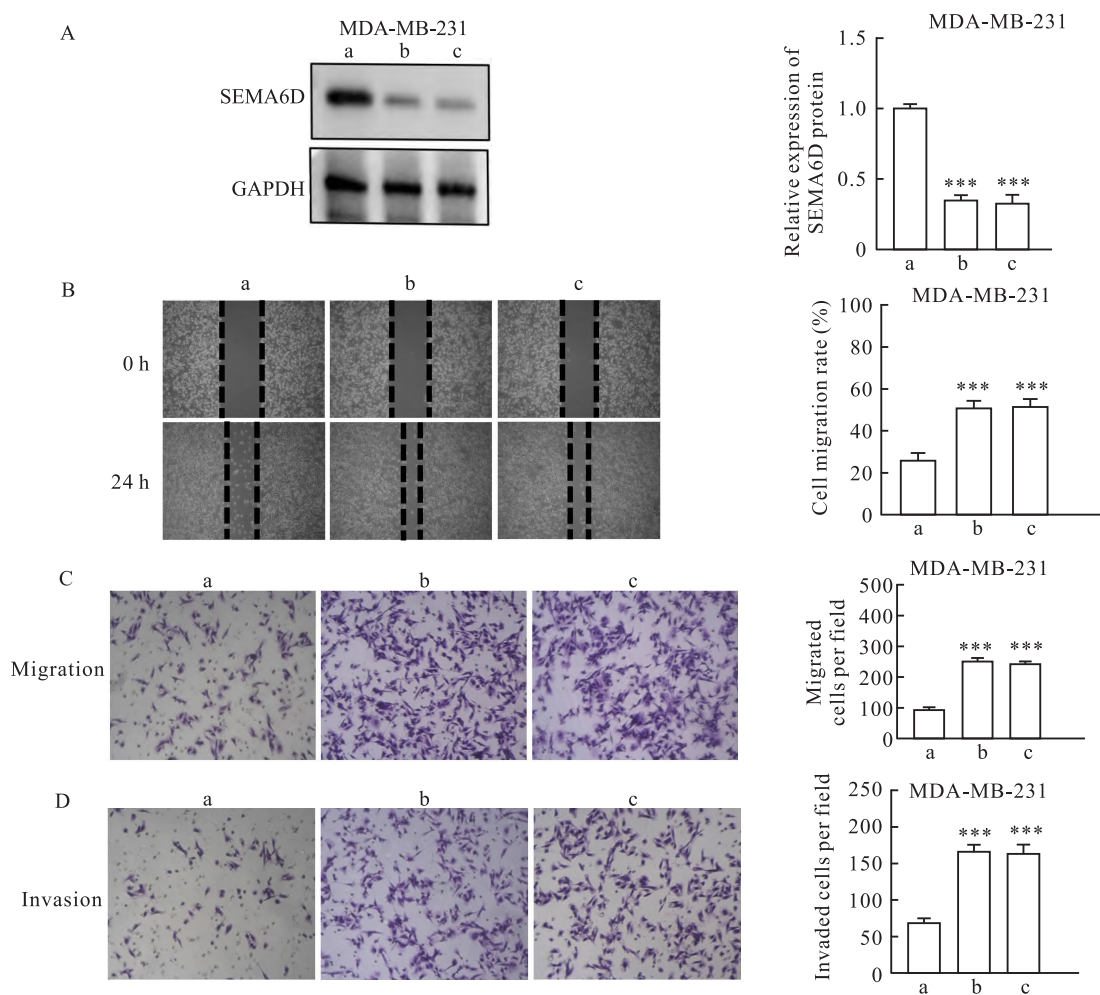
Sample	AURKA		χ^2 value	P value
	High	Low		
TNBC	41 (50.0)	41 (50.0)	5.384	<0.05
Paracancer non-tumor tissues	14 (29.2)	34 (70.8)		

表4 AURKA 蛋白与 TNBC 患者

临床病理特征的关系[$n(\%)$]Tab.4 Relationship between AURKA protein and clinicopathologic features of TNBC patients [$n(\%)$]

Characteristic	AURKA		χ^2 value	P value
	High	Low		
Age (years)			3.258	0.196
<35	4 (9.8)	2 (4.9)		
35-55	19 (46.3)	27 (65.9)		
>55	18 (43.9)	12 (29.2)		
Tumor size (cm)			4.201	0.040
≤ 2	11 (26.8)	20 (48.8)		
>2	30 (73.2)	21 (51.2)		
Menopausal state			1.222	0.269
Premenopausal	17 (41.5)	22 (53.7)		
Postmenopausal	24 (58.5)	19 (46.3)		
Grade			6.681	0.010
I + II	8 (19.5)	19 (46.3)		
III	33 (80.5)	22 (53.7)		
Stage			5.632	0.018
I	8 (19.5)	18 (43.9)		
II + III	33 (80.5)	23 (56.1)		
Lymph node metastasis			4.970	0.026
No	29 (70.7)	37 (90.2)		
Yes	12 (29.3)	4 (9.8)		
Ki67			5.149	0.076
<25%	2 (4.9)	7 (17.1)		
25%-50%	12 (29.3)	16 (39.0)		
>50%	27 (65.8)	18 (43.9)		

2.4 SEMA6D 与 AURKA 表达的相关性及其对乳腺癌细胞 EMT 的影响 IHC 结果显示在 TNBC 组织中 SEMA6D 蛋白和 AURKA 蛋白均高表达者 7 例、均低表达者 23 例、SEMA6D 蛋白高表达而 AURKA 蛋白低表达者 18 例、SEMA6D 蛋白低表达而

图2 敲低 *SEMA6D* 对 TNBC 细胞迁移和侵袭的影响Fig. 2 The effects of the knockdown of *SEMA6D* on TNBC cell migration and invasion

A: WB detection of *SEMA6D* protein expression levels in three groups; B: The effect of the knockdown of *SEMA6D* on migration of MDA-MB-231 cells determined by wound healing assay $\times 40$; C: The effect of knocking down *SEMA6D* on MDA-MB-231 cell migration detected by Transwell assay $\times 100$; D: The effect of knocking down *SEMA6D* on MDA-MB-231 cell invasion detected by Transwell assay $\times 100$; a: shCtrl group; b: shSEMA6D-1 group; c: shSEMA6D-2 group; *** $P < 0.001$ vs shCtrl group.

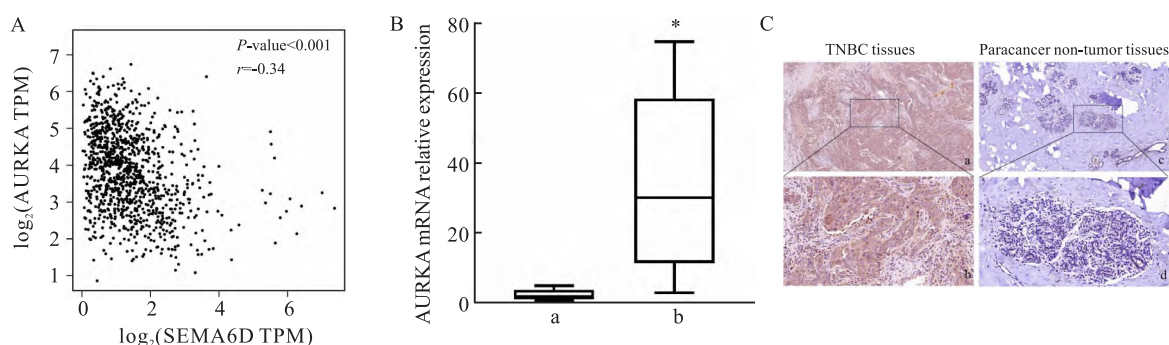


图3 AURKA 在 TNBC 组织中的表达水平及与临床病理特征的相关性

Fig. 3 The expression level of AURKA in TNBC tissues and its correlation with clinicopathologic features

A: Screening for genes negatively associated with *SEMA6D* based on the cBioPortal and GEPIA2 databases; B: The expression level of AURKA mRNA in TNBC and normal breast tissues from the UALCAN database; C: The expression of AURKA in clinical paraffin sample sections detected by IHC (a, c: $\times 100$; b, d: $\times 400$); a: Normal breast group; b: TNBC group; * $P < 0.05$ vs Normal breast group.

AURKA 蛋白高表达者 34 例, TNBC 组织中 SEMA6D 蛋白表达水平与 AURKA 蛋白表达水平呈负相关 ($r = -0.291, P < 0.01$, 表 5); 使用 WB 检测敲低 SEMA6D 后 AURKA 蛋白及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 标志物蛋白的表达水平, 结果显示: 敲低 SEMA6D 后, 细胞 AURKA 表达水平上调; 上皮标志物 Claudin-1 表达降低; 间充质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 表达升高 ($t_{\text{Claudin-1}} = 14.32, 11.58, t_{\text{N-cadherin}} = 7.09, 9.78, t_{\text{Vimentin}} = 13.17, 9.87, t_{\text{AURKA}} = 6.64, 8.93$, 均 $P < 0.01$, 图 4)。以上结果证明敲低 SEMA6D 的表达能够促进肿瘤细胞 AURKA 的表达和 EMT 进展。

表 5 SEMA6D 与 AURKA 蛋白在 TNBC 组织中的相关性

Tab. 5 Correlation between SEMA6D and AURKA proteins in TNBC tissues

SEMA6D	AURKA		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i> value
	Low	High			
Low	23	34	57	-0.291	0.008
High	18	7	25		

3 讨论

基于 ER、PR 和 HER2 等分子表达状况, 可以将乳腺癌分为激素受体阳性、HER2 阳性和 TNBC 三种亚型。TNBC 是乳腺癌中恶性程度最高的亚型, 预后较差, 目前的治疗方案主要有手术治疗、辅助化疗和放疗。然而, 一部分 TNBC 患者在确诊时已错

过了手术时机, 非手术治疗 TNBC 的标准疗法仍然是以非特异性化疗为主, 但只有不到 30% 的 TNBC 患者获得完全应答, 复发率和病死率仍高于非 TNBC 亚型^[6]。因此, 寻求新的治疗靶点对提高 TNBC 患者的治疗效果和改善预后具有重要意义。

SEMA6 类家族属于跨膜蛋白, 其结构由 SEMA 结构域、跨膜结构域和胞质结构域构成, SEMA 结构域包含丛蛋白和神经纤毛蛋白受体的结合基序^[7]。SEMA6 类家族蛋白能够通过刺激与受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 共享共同结构域的丛蛋白和神经纤毛蛋白, 调节特定 RTKs 的细胞信号传导, 如酪氨酸激酶下游效应途径如 PI3K/Akt、MAPK/ERK 和第二信使等, 这些通路和分子的激活进而导致肿瘤的发生发展^[8]。SEMA6D 在多种肿瘤中异常表达, 曲等^[5]研究表明 SEMA6D 蛋白在胃癌组织中高表达, 与胃癌肿瘤分化程度、侵袭性、淋巴结转移和 TNM 分期呈正相关。Duan et al^[9] 研究显示 SEMA6D 在肾透明细胞癌组织中的表达低于正常组织, 过表达可抑制肾透明细胞癌的增殖、迁移和侵袭。然而, SEMA6D 在乳腺癌 TNBC 亚型中的作用机制尚不明确。因此, 本研究首先基于 UALCAN 数据库分析发现 SEMA6D 的 mRNA 水平在 TNBC 中表达显著下调, 进一步通过临床样本检测发现 SEMA6D 在 TNBC 组织中低表达, 且 SEMA6D 表达与肿瘤大小、组织学分级、临床分期和淋巴结转移均呈负相关。为探索 SEMA6D 在 TNBC 中的生物学功能, 本研究构建了稳定低表达 SEMA6D 的

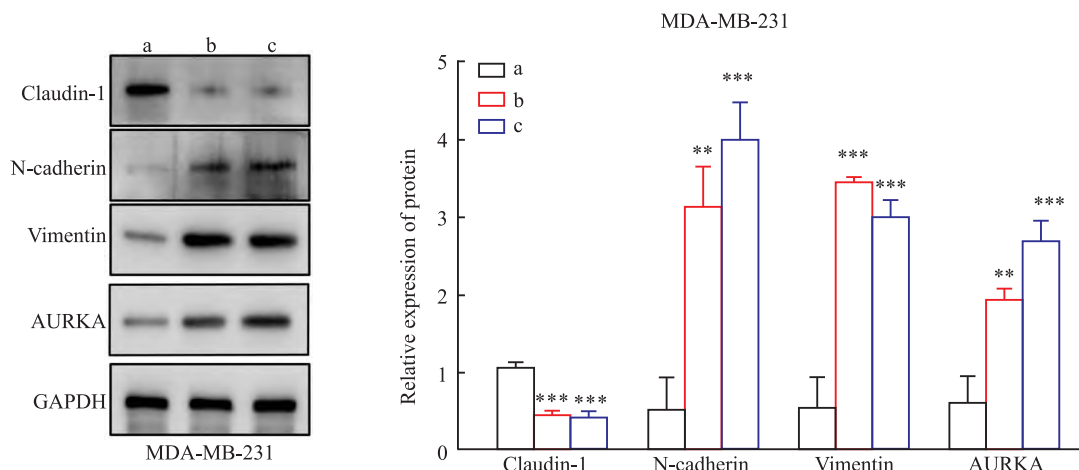


图 4 敲低 SEMA6D 对 AURKA 的蛋白表达及 EMT 蛋白标志物的影响

Fig. 4 The effect of the knockdown of SEMA6D on AURKA expression and EMT protein marker

a: shCtrl group; b: shSEMA6D-1 group; c: shSEMA6D-2 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs shCtrl group.

MDA-MB-231 细胞进行体外实验,结果表明敲低 *SEMA6D* 能够促进 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力。以上提示 *SEMA6D* 能够抑制 TNBC 细胞的恶性生物学行为。

AURKA 属于丝氨酸/苏氨酸激酶,它与其他家族成员共享一个高度保守的催化结构域,包含自磷酸化位点,在有丝分裂过程中调控细胞分裂上发挥重要作用^[10]。*AURKA* 的过表达或基因扩增/突变发生在不同类型的癌症中,包括肺癌、结直肠癌和乳腺癌等;通过促进细胞周期进程、激活细胞存活和抗凋亡或坏死性凋亡信号传导、诱导基因组不稳定性、EMT 和癌症干细胞在调节肿瘤发生和进展中发挥多种作用^[11]。本研究基于公共数据库筛选以及 UALCAN 数据库分析发现 *AURKA* 的 mRNA 水平在 TNBC 中表达显著上调,进一步通过临床样本检测发现 *AURKA* 在 TNBC 组织中高表达,且 *AURKA* 表达与肿瘤大小、组织学分级、临床分期和淋巴结转移均呈正相关。这与先前在 TNBC 中的报道一致^[12]。EMT 是上皮细胞失去自身特性成为间充质细胞的可逆过程,细胞黏附分子和细胞骨架的表达发生改变,在肿瘤进展和转移过程中,EMT 的异常激活与肿瘤细胞的恶性特性有关,包括促进迁移和侵袭性,增加肿瘤干性,增强对化疗和免疫治疗的抵抗力^[13]。Li et al^[14] 研究表明 *AURKA* 通过 PI3K/Akt 通路促进 EMT 转化,参与神经母细胞瘤的进展。本研究发现敲低 *SEMA6D* 后 *AURKA* 蛋白表达水平上调,同时上皮标志物表达水平降低,间充质标志物表达水平升高。本研究结果结合文献报道,提示 *SEMA6D* 可能通过调控 *AURKA* 的表达以及 EMT 的进展抑制 TNBC 细胞的恶性生物学行为。

综上所述,本研究通过生物信息学分析、临床样本检测和体外实验等研究发现 *SEMA6D* 在 TNBC 中低表达,通过调控 *AURKA* 的表达及 EMT 抑制 TNBC 细胞恶性进展,提示 *SEMA6D* 可能是 TNBC 潜在的生物学标志物,可以为后续病理诊断、临床个体化治疗和预后提供一定的理论参考。

参考文献

- [1] Wang X, Wang C, Guan J, et al. Progress of breast cancer basic research in China[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(8): 2069–79. doi: 10.7150/ijbs.60631.
- [2] Garrido-Castro A C, Lin N U, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment[J]. Cancer Discov, 2019, 9(2): 176–98. doi: 10.1158/2159–8290.CD–18–1177.
- [3] Gunyuz Z E, Sahi-Ilhan E, Kucukkose C, et al. *SEMA6D* differentially regulates proliferation, migration, and invasion of breast cell lines[J]. ACS Omega, 2022, 7(18): 15769–78. doi: 10.1021/acsomega.2c00840.
- [4] Zhang W, Xia D, Li Z, et al. Aurora-A/ERK1/2/mTOR axis promotes tumor progression in triple-negative breast cancer and dual-targeting Aurora-A/mTOR shows synthetic lethality[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 606. doi: 10.1038/s41419–019–1855–z.
- [5] 曲思璇, 杨兆丽, 陶洪迪, 等. 脑信号蛋白 6D (SEMA6D) 与 Snail 蛋白在胃癌组织高表达且与恶性临床病理指标呈正相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(10): 932–7. doi: 10.13423/j.cnki.cjmi.008927.
- [5] Qu S X, Yang Z L, Tao H D, et al. Semaphorin 6D and Snail are highly expressed in gastric cancer and positively correlated with malignant clinicopathological indexes[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2019, 35(10): 932–7. doi: 10.13423/j.cnki.cjmi.008927.
- [6] Li Y, Zhang H, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 121. doi: 10.1186/s13045–022–01341–0.
- [7] Wagner W, Ochman B, Wagner W. Semaphorin 6 family-an important yet overlooked group of signaling proteins involved in cancerogenesis[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(23): 5536. doi: 10.3390/cancers15235536.
- [8] Bica C, Tirpe A, Nutu A, et al. Emerging roles and mechanisms of semaphorins activity in cancer[J]. Life Sci, 2023, 318: 121499. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121499.
- [9] Duan J, Jin M, Qiao B. Semaphorin 6D as an independent predictor for better prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. Transl Oncol, 2022, 22: 101453. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101453.
- [10] Du R, Huang C, Liu K, et al. Targeting *AURKA* in cancer: molecular mechanisms and opportunities for cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 15. doi: 10.1186/s12943–020–01305–3.
- [11] Zheng D, Li J, Yan H, et al. Emerging roles of Aurora-A kinase in cancer therapy resistance[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(7): 2826–43. doi: 10.1016/j.apsb.2023.03.013.
- [12] Skov N, Alves C L, Ehmsen S, et al. Aurora kinase A and bcl-xL inhibition suppresses metastasis in triple-negative breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10053. doi: 10.3390/ijms231710053.
- [13] Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 129. doi: 10.1186/s13045–022–01347–8.
- [14] Li M, Sun C, Bu X, et al. *ISL1* promoted tumorigenesis and EMT via Aurora kinase A-induced activation of PI3K/AKT signaling pathway in neuroblastoma[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6): 620. doi: 10.1038/s41419–021–03894–3.

SEMA6D inhibits the malignant progression of triple-negative breast cancer through AURKA

Zhou Jingni¹, Zhao Rongrong¹, Luo Wenwu¹, Wang Xian², Guo Qianying¹, Wu Zhengsheng^{1,3}

(¹Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

³Dept of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To explore the role of semaphoring 6d (SEMA6D) in the malignant progression of triple-negative breast cancer (TNBC). *Methods* Bioinformatics and Immunohistochemistry (IHC) were used to analyze the expression level of SEMA6D in TNBC and paracancer non-tumor tissues and its relationship with patients' clinicopathological features. MDA-MB-231 cell line stably knocking down the expression of SEMA6D was constructed, and the effects of SEMA6D on migration and invasion of TNBC cells were investigated by Wound-healing assays and Transwell assays. cBioPortal and GEPIA2 databases were used to screen out the gene negatively associated with it, namely aurora kinase A (AURKA). Bioinformatics and IHC were used to analyze the expression level of AURKA in TNBC and paracancer non-tumor tissues and its relationship with patients' clinicopathological features. Western blot assay was used to analyze the expression of AURKA and the effect of epithelial-mesenchymal transition (EMT) makers Claudin-1, N-cadherin and Vimentin after knocking down *SEMA6D*. *Results* Bioinformatics analysis and IHC results showed that the expression of SEMA6D in TNBC tissues was significantly lower than that in paracancer non-tumor tissues (both $P < 0.05$). The expression of AURKA in TNBC tissues was significantly higher than that in paracancer non-tumor tissues (both $P < 0.05$), SEMA6D and AURKA were significantly negatively correlated in TNBC ($P < 0.01$). Both low expression of SEMA6D and high expression of AURKA were positively correlated with tumor size, tumor histological grade, clinical stage and lymph node metastasis in TNBC patients (all $P < 0.05$). The knockdown of *SEMA6D* significantly promoted the migration and invasion ability of TNBC cells (both $P < 0.01$). Western blot results showed that the knockdown of *SEMA6D* upregulated AURKA expression, promoted the expression of N-cadherin and Vimentin, and inhibited the expression of Claudin-1 in tumor cells. *Conclusion* Down-regulation of SEMA6D expression in TNBC may be involved in the malignant progression of TNBC through up-regulation of AURKA expression and promotion of EMT.

Key words triple-negative breast cancer; semaphoring 6D; AURKA; migration; invasion; EMT

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82473059); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj190)

Corresponding author Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn