

Investigating lncRNA *GAPLINC* Expression Level in Metastatic and Non-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Samples

Shiva Soleimani¹, Farkhondeh Pouresmaeili*², Iman Salahshourifar¹

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Men's Health and Reproductive Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: For the first time in this study, we investigated the expression level of lncRNA *GAPLINC* in metastatic and non-metastatic triple-negative breast cancer tissue samples using real-time PCR technique in order to find a possible marker in the diagnosis of metastatic triple-negative breast cancer.

Materials and Methods: After selecting the candidate lncRNA and designing primers on target gene sequence, the expression level of lncRNA *GAPLINC* was quantified using RT-qPCR with specific primers and SYBR Green on 50 fresh tissue samples, including 20 triple-negative metastatic and 20 non-metastatic breast cancer tissues, and 10 control tissue samples. The internal control used in this study included the *β-actin* gene, a more suitable control in terms of stability of expression compared to other genes in breast cancer molecular tests. GraphPad Prism software was used for statistical analysis and Adj. p-value < 0.05 was considered as a significant level.

Results: An increase was observed in the expression level of lncRNA *GAPLINC* in triple-negative breast cancer samples compared to non-metastatic triple-negative breast cancer samples, with Adj. p-value < 0.05.

Conclusion: *GAPLINC* can serve as a potential biomarker in the diagnosis of metastatic from non-metastatic breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Triple negative, Metastatic, lncRNA *GAPLINC*, Biomarker.

*Corresponding Author:

Farkhondeh Pouresmaeili, Men's Health and Reproductive Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: pouresfar@gmail.com.

بررسی میزان بیان *lncRNA GAPLINC* در نمونه های سرطان پستان سه گانه منفی در نمونه های متاستاتیک و غیرمتاستاتیک

شیوا سلیمانی^۱، فرخنده پوراسماعیلی*^۲، ایمان سلحشوری^۱

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلامت مردان و بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان *lncRNA GAPLINC* برای اولین بار در نمونه های بافت سرطان پستان سه گانه منفی متاستاتیک و غیرمتاستاتیک با استفاده از تکنیک Real-Time PCR به منظور یافتن مارکر احتمالی در تشخیص سرطان پستان سه گانه منفی متاستاتیک می باشد.

مواد و روش‌ها: پس از انتخاب *lncRNA* کاندید و طراحی پرایمرها بر روی توالی ژن هدف، RT-quantitative PCR با استفاده از پرایمرها و سایبرگرین بر روی ۵۰ نمونه بافت تازه شامل ۲۰ نمونه بافت سرطان پستان سه گانه منفی متاستاتیک، ۲۰ نمونه بافت سرطان پستان غیرمتاستاتیک و ۱۰ نمونه کنترل انجام شد. در این مطالعه از ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید که طبق مطالعه‌های صورت گرفته کنترل مناسبتری از نظر پایداری بیان در مقایسه با سایر ژنها در آزمایش‌های مولکولی سرطان پستان می باشد.

برای آنالیز آماری از نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده و p -value $< 0/05$ Adj. به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. یافته‌ها: افزایشی در سطح بیان *lncRNA GAPLINC* در نمونه‌های سرطان پستان سه گانه منفی در مقایسه با نمونه‌های سرطان پستان سه گانه منفی غیرمتاستاتیک با مقدار p کمتر از $0/05$ مشاهده شد.

نتیجه گیری: *GAPLINC* می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه در تشخیص سرطان پستان متاستاتیک از غیرمتاستاتیک عمل کند.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، سه گانه منفی، متاستاز، *lncRNA GAPLINC*، بیومارکر.

نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلامت مردان و بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیکی:

pouresfar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴

۱- مقدمه

سرطان پستان، شایعترین سرطان در بین زنان در سراسر جهان است که حدود ۱۰ درصد از آنان را در مراحل

و این موضوع که ژنهای گدکننده پروتئین تنها عامل در بروز بیماری‌های انسانی هستند را به چالش میکشد (۱۳، ۱۴).

گیرگدکننده یکی از مهم‌ترین فاکتورهای اپی ژنتیکی می‌باشد که نقش حائز اهمیتی در تنظیم چرخه سلولی، تنظیم بیان ژن، ابتلا به بیماریهایی همچون سرطان، فعال کردن سیستم ایمنی، میزان بدخیمی، آنژیوژن، متاستاز، تومور-زایی، درمان و مقاومت دارویی ایفا میکند. این اثرگذاری از طریق مسیرهای متنوع به صورت مستقیم یا از طریق روشهای اپی ژنتیک انجام میپذیرد و بیان ژنهای مرتبط با متاستاز، مقاومت دارویی و یا بدخیمی را دستخوش تغییرها میکند (۱۵). مطالعه‌های گسترده Omics نشان داده اند که lncRNAها میتوانند به عنوان بیومارکر در تشخیص و میزان پیشرفت بدخیمی در نظر گرفته شوند و با نقشی که در تکثیر سلولی و یا آپوپتوز سلولی دارند، گروهی باعث پیشرفت بیماری و گروهی دیگر در جلوگیری از گسترش سرطان پستان مؤثر هستند (۱۶-۱۹). افزایش یا کاهش بیان lncRNAها در برخی سلولهای سرطانی در مقایسه با سلولهای نرمال تأکیدی بر تنوع عملکرد آنها در سلولها و بافتهای متفاوت میباشد و با تأثیر در بیان ژن در مقاومت دارویی نیز نقش ویژه ای را ایفا میکنند. همچنین، مطالعه‌هایی نشان داده اند که lncRNAها دارای تأثیر بسیار زیادی بر روند سرطان و مخصوصاً بروز متاستاز دارند (۲۰، ۱۵، ۲۱).

GAPLINC یک ژن غیرگدکننده و یک lncRNAی حفاظت شده در انسان و موش میباشد. جایگاه ژن آن روی کروموزوم ۱۸ است. این lncRNA به عنوان یک تنظیم کننده در مسیر سیگنالینگ NF- κ B نقش دارد. علاوه بر این آزمایش‌ها نشان داده اند که *GAPLINC* با برخی miRNAها در ارتباط بوده و به صورت یک Inc اسفنجی با اتصال به برخی miRNAها در تنظیم بیان ژن ایفای نقش مینماید. نقش *GAPLINC* در بسیاری از بدخیمی‌ها به ویژه تهاجم بافتی مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، نتایج آزمایشها نشان داده که افزایش بیان آن باعث افزایش تهاجم سلولهای سرطان کلورکتال میگردد (۶، ۱۴، ۲۲ و ۲۳). علاوه بر این، مطالعه‌هایی به نقش *GAPLINC* در تومورزایی، رگ‌زایی و افزایش تهاجم به سایر بافتها در سرطان معده پرداختند که بنابر نتایج به دست آمده، ارتباط مستقیمی بین افزایش بیان *GAPLINC* و میزان بدخیمی به ویژه متاستاز سرطان معده وجود دارد (۲۴). تاکنون هیچ مطالعه ای بر روی چگونگی این lncRNA بر روی متاستاز سرطان پستان سه گانه منفی و

مختلف زندگی مبتلا ساخته و ابعاد مختلف زندگی آنها را تحت تأثیر قرار میدهد. این سرطان، شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان ایرانی است (۱، ۲). اگرچه میزان مرگ و میر ناشی از آن روبه کاهش است ولی در بین شایع‌ترین دلیل مرگ و میر سرطان در زنان، در رده دوم قرار دارد. سرطان پستان انواع متفاوتی دارد که این دسته بندیها براساس بافت درگیر، تهاجمی و غیرتهاجمی بودن و مارکرهای مولکولی رستپورهای (گیرنده‌ها) استروژن و پروژسترون و فاکتور رشد اپیدرمی صورت میگیرد (۳-۶).

حدود ۱۰ الی ۲۰ درصد از سرطانهای پستان، سه گانه منفی سرطانی هستند که از نظر گیرنده های استروژن، گیرنده‌های پروژسترون و همچنین پروتئین اضافی HER2^۱ منفی است (۷). احتمال عود این سرطان یا عود مجدد پس از درمان، بیشتر از سایر سرطانهای پستان است. این خطر عود در حدود ۳ سال پس از تشخیص بیشتر است (۸-۱۰). خطر عود دیر هنگام بعد از پنج سال در افراد مبتلا به سرطان سه گانه منفی کمتر است. گرایش به داشتن گرید (درجه) بالاتری نسبت به سایر انواع سرطان پستان دارد و در مقیاس ۱ تا ۳، سرطان پستان سه گانه منفی اغلب گرید ۳ را دارد. این نوع سرطان معمولاً نوعی سلول به نام شبه بازال دارد و به همین دلیل تهاجمی تر بوده و از آنجاکه هورمون‌های رشد، این نوع سرطان پستان را تحریک نمیکند با احتمال کمتری به داروهای هورمون درمانی از جمله تاموکسیفن و مهارکننده های آروماتاز پاسخ میدهد (۱، ۲، ۱۱). بنابراین، شناسایی lncRNAهای^۲ مؤثر در بیان ژنهای شناسایی شده و مرتبط با متاستاز سرطان، بسیار حائز اهمیت میباشد (۱۲).

ژنهای گدکننده پروتئین، تنها ۲ تا ۳ درصد از ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند درحالیکه بیش از ۷۵ درصد ژنوم به RNAهای غیرگدکننده رونویسی میشوند. RNAهای بلند غیرگدکننده (lncRNA) یک کلاس از رونوشتهای غیرگدکننده با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید در ژنوم انسان میباشد که عملکرد خود را از طریق مکانیسمهای متعددی شامل فراخواندن کمپلکس‌های تغییردهنده کروماتین به جایگاههای خاصی از ژنوم و ایجاد داربستهای مولکولی، تعدیل فرایند رونویسی و تنظیم بیان miRNAها^۳ انجام میدهند. مطالعه‌های اخیر بر نقش فزاینده این lncRNAها در پاتوژنز بیماریهای مختلف تأکید دارند

¹ Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (HER2)

² Long noncoding RNA (lncRNA)

³ MicroRNA (miRNA)

⁴ Nuclear factor kappa B (NF- κ B)

پاتولوژیست از بانک تومور ایران تهیه و نمونه های بافت به آزمایشگاه منتقل شدند. تمامی افراد از نظر جنسیت خانم بوده و نمونه گیری زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.۱۴۰۲،۰۰۲ صورت گرفت.

پاتولوژی بیماران مورد مطالعه نیز در جدول ۱ آورده شده است.

بررسی نقش بیومارکری آن در این بدخیمی صورت نگرفته است.

۲- مواد و روشها

در این مطالعه، ۲۰ نمونه بافت مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک سه گانه منفی و همچنین ۲۰ نمونه بافت مبتلا به سرطان پستان سه گانه منفی غیرمتاستاتیک و ۱۰ نمونه بافت سالم پستان قبل از درمان و پس از تأیید توسط

جدول ۱- پاتولوژی نمونه های مطالعه

مشخصات	تعداد (۵۰)
سن	تعداد (۵۰)
50<	18
50>	32
جنس	تعداد (۵۰)
مرد	0
زن	50
TNM.M stage	تعداد (۵۰)
M0	20
M1	20
سایز تومور	تعداد (۵۰)
>۵ سانتی متر	21
<۵ سانتی متر	19

جهت انتخاب *lncRNA GAPLINC* از مقاله های مطالعه های پیشین استفاده شد که به نقش آن در تومورزایی، رگزایی و تهاجم بافتی در سرطانهای مختلف اشاره شده است. پس از انتخاب *lncRNA* هدف مطالعه، توالی آن جهت طراحی پرایمر از سایت NCBI دریافت شد و پرایمرها توسط نرم افزار Gene Runner طراحی و با سایر نرم افزارها همچون YOLIGO و NCBI Blast بررسی و تأیید گردیدند. توالی و مشخصات پرایمرها نیز در جدول ۲ نشان داده شده است.

نام ژن	نام پرایمر	توالی	دما	اندازه محصول PCR (جفت باز)	ژن
GAPLIN C	پرایمر فوروار د	3'-AAGCTGGACTCAGGGTATGC-5'	46/59	90	GAPLIN C Ensemble: ENSG00000266835
	پرایمر ریور س	3'-GGTTTCTTCATTGTTCTGGCCTC-5'	06/60		
β-actin	پرایمر فوروار د	3'-AGAAAATCTGGCACCACACC-5'	38/58	173	β-actin Ensemble: ENSG00000075624
	پرایمر ریور س	3'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-5'	80/58		

۲۶ ثانیه (گسترش) در شکل ۳ اختصاصیت پرایمرها با منحنی ذوب نشان داده شده است.

۲-۱- آنالیز آماری

پس از انجام واکنش real-time PCR برای آنالیز آماری و ترسیم و نمایش نمودارها از نرم افزار GraphPad Prism ورژن ۸ استفاده و برای بررسی میزان حساسیت و اختصاصیت، آنالیز ROC انجام شد و $p < 0/05$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد (۲۹).

جدول ۳- حجم مواد جهت انجام واکنش Real-Time PCR

مواد لازم جهت واکنش	حجم (ماکرولیتتر)
پرایمر فوروار	5/0
پرایمر ریور	5/0
مستر میکس سایبر (امپلیکون)	5
آب مقطر استریل	3
حجم cDNA	1
مجموع حجم هر واکنش	10

به منظور تأیید صحت آزمایش و تعیین اندازه دقیق محصول در ژل آگارز ۱ درصد، سایز مارکر، محصول PCR و کنترل منفی نیز الکتروفورز انجام شد تا اندازه دقیق محصول و هم صحت انجام آزمایش اثبات شود.

استخراج RNA با استفاده از تریزول انجام شد و RNA استخراج شده با آنزیم (U/μL DNase I) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شد و کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. همچنین غلظت RNAها با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد. جهت تهیه^۵ cDNA از کیت AccuPower® RT/PCR PreMix استفاده شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر total RNA و ۲ میکرولیتر کیت primer random و ۸ میکرولیتر آب مقطر به میکروتیوب مخصوص اضافه شد. سپس PCR طبق برنامه ی دمایی (۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت و ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. پس از انجام PCR، با استفاده از دستگاه پیکودراپ، دانسیته نوری (OD) در ۲۶۰ و ۲۸۰ اندازه گیری شد.

با استفاده از تکنیک Real-Time PCR، میزان بیان ژن GAPLIN C به همراه ژن کنترل داخلی β-actin در همه نمونه های متاستاتیک، غیرمتاستاتیک و نرمال بررسی شد. به منظور بررسی کمی بیان lncRNA از سایبرگرین با حجم واکنش ۱۰ ماکرولیتر مطابق با جدول ۳ و طبق برنامه دمایی زیر استفاده شد:

ابتدا دناتوراسیون اولیه (۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱ چرخه)، سپس ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۱۵ ثانیه (دناتوراسیون)، ۶۰ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۲۵ ثانیه (اتصال) و ۷۲ درجه سانتی گراد در دمای

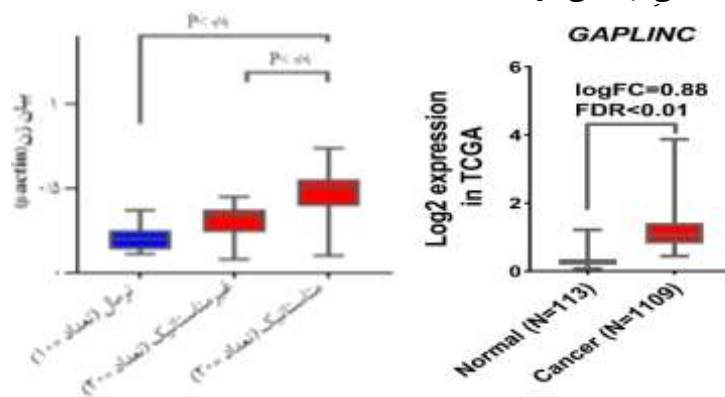
⁵ Complementary DNA

نمونه‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی غیرتهاجمی و نرمال به میزان ۱/۸۴ برابر افزایش یافته است.

($p > 0.013$ و $\text{Log FC} 0.88$). شکل ۱ مربوط به بیان ژن *GAPLINC* می‌باشد. محصول PCR بر روی ژل آگارز باند ۹۰ جفت‌بازی مشاهده شد که تأییدکننده صحت آزمایش می‌باشد (شکل ۲).

۳- نتایج

نتایج نشان دادند که بیان ژن *GAPLINC* در نمونه‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی تهاجمی در مقایسه با



شکل ۱- افزایش بیان ژن *GAPLINC* در نمونه‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی متاستاتیک در مقایسه با سرطان پستان سه‌گانه منفی غیرمتاستاتیک و نرمال



شکل ۲- باند ۹۰ جفت‌بازی محصول واکنش **Real-Time PCR** تأییدی بر صحت آزمایش. ستون‌های ۳ و ۴: **PCR**; لاین ۵: **NTC (non-template control)**; لاین **M**: مارکر.

۴- بحث

زنان مبتلا به این نوع سرطان، حداقل به مدت پنج سال زنده ماندند، درحالی‌که این رقم در زنان مبتلا به سایر انواع سرطان پستان ۹۳ درصد می‌باشد، یافتن نشانگرهای زیستی به منظور تشخیص زودهنگام سرطان پستان سه‌گانه منفی با روش‌های غیرتهاجمی امری حیاتی می‌باشد (۱، ۱۰ و ۲۵). علاوه بر این در سرطانهای پستان مهاجم سلولهای سرطانی به خارج از مجاری و لوبول‌های نرمال پستان نفوذ و حمله میکنند و درون بافت هم‌بند پستان و بافت استرومای اطراف پستان رشد میکنند. کارسینومای مهاجم پتانسیل گسترش به

سرطان پستان سه‌گانه منفی یک نوع سرطان پستان است و نسبت به سایر سرطان‌های پستان سیر تهاجمی‌تری دارد (۲۶) و به علت داشتن سلولهای شبه بازال گرایش بیشتری به داشتن مرحله بالاتری از بدخیمی نسبت به سایر انواع سرطان پستان دارد (۹، ۱۰). با توجه به این امر که مطالعه صورت‌گرفته در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ۷۷ درصد از

1. Lyons TG. Targeted therapies for triple-negative breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 2019. 20(11): 82.
2. Li CI, Malone K, Daling JR. Differences in breast cancer hormone receptor status and histology by race and ethnicity among women 50 years of age and older. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. 11(7): p. 601-7.
3. Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Gralow JR, Cardoso F, Siesling S, Soerjomataram I. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, 2022. 66: 15-23.
4. Boere I, Lok C, Poortmans P, Koppert L, Painter R, Heuvel-Eibrink MMVD, Amant F. Breast cancer during pregnancy: epidemiology, phenotypes, presentation during pregnancy and therapeutic modalities. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2022. 82: 46-59.
5. Ferley J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): E359-386.
6. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public health*, 2000. 114(2): 143-145.
7. Irvin Jr WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008, 44(18): 2799-2805.
8. Huo D, Ikpat F, Khramtsov A, Dangou JM, Nanda R, Dignam J, Zhang B, Grushko T, Zhang C, Oluwasola O, Malaka D, Malami S, Odetunde B, Adeoye AO, Iyare F, Falusi A, Perou CM, Olopade OI. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009, 27(27): 4515-4521.
9. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2018. 392(10159): 1789-1858.
10. Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD, Smith L. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol*, 2013. 86(1023): 20120601
11. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. *Int J Oncol*, 2020. 57(6): 1245-1261.
12. Naorem LD, Prakash VS, Muthaiyan M, Venkatesan A. Comprehensive analysis of dysregulated lncRNAs and their competing endogenous RNA network in triple-negative breast cancer. *Int J Biol Macromol*, 2020. 145: 429-436.
13. Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: an innate immune perspective. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020. 1863(4): 194419.
14. Wang W, Min L, Qiu X, Wu X, Liu C, MA J, Zhang D. Biological function of long non-coding RNA (lncRNA) Xist. *Front Cell Dev Biol*, 2021. 9: 645647.
15. Yamada A, Ishikawa T, Ota I, Kimura M, Shimizu D, Tanabe M, Chishima T, Sasaki T, Ichikawa Y, Morita S, Yoshiura K, Takabe K, Endo I. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. 137(3): 773-782.
16. Xia R, Geng G, Yu X, Xu Z, Guo J, Liu H, Li N, Li Z, Li Y, Dai X, Luo Q, Jiang J. LINC01140 promotes the progression and tumor immune escape in lung cancer by sponging multiple microRNAs. *J Immunother Cancer*, 2021. 9(8).
17. Xu J, Zhang P, Sun H, Liu Y. LINC01094/miR-577 axis regulates the progression of ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2020. 13(1): 1-9.
18. Yang G, Lu X, Yuan L. lncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1839(11): 1097-1109.
19. Zong Y, Zhang Y, Hou D, Xu J, Cui F, Qin Y, Sun X. The lncRNA XIST promotes the progression of breast cancer by sponging miR-125b-5p to modulate NLRC5. *Am J Transl Res*, 2020. 12(7): 3501-3511.
20. Nasim N, Ghafouri-Fard S, Soleimani S, Esfandi F, Shirkhoda M, Safaei M, Oskooei VK, Taheri M, Raheb J. Assessment of SGO1 and SGO1-AS1 contribution in breast cancer. *Human Antibodies*, 2019. 27(4): p. 279-284.
21. Sun Q, Li Q, Xie F. lncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: 6297-6307.
22. Mo BY, Guo XH, Yang MR, Liu F, Bi X, Liu Y, Fang LK, Luo XQ, Wang J, Bellanti JA, Pan YF, Zheng SG. Long non-coding RNA GAPLINC promotes tumor-like biologic behaviors of fibroblast-like synoviocytes as microRNA sponging in rheumatoid arthritis patients. *Front Immunol*, 2018. 9: 702.
23. Yang P, Chen T, Xu Z, Zhu H, Wang J, He Z. Long noncoding RNA GAPLINC promotes invasion in colorectal cancer by targeting SNAI2 through binding with PSF and NONO. *Oncotarget*, 2016. 7(27): 42183-42194.
24. Zhao J, Wang C, Liu S, Su X, Ouyang A. TGF-β1 mediates lncRNA GAPLINC expression to promote the migration and invasion of non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: 6175-6180.

25. Mousavi SM, Montazeri A, Nohagheghi MA, Mousavi Jarrahi A, Harrirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J*, 2007. 13(4): 383-391.
26. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2019. 11:151-164.
27. Ye H, Wang J, Qian J, Kong X, Tang J, Wang Y, Chen H, Hong J, Zou W, Chen Y, Xu J, Fang JY. Long noncoding RNA GAPLINC regulates CD44-dependent cell invasiveness and associates with poor prognosis of gastric cancer. *Cancer Res*, 2014. 74(23):6890-6902.
28. Chen HH, Zong J, Wang SJ. LncRNA GAPLINC promotes the growth and metastasis of glioblastoma by sponging miR-331-3p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019. 23 (1): 262-270.
29. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Onco TargetsNat Protoc*, 2008. 3: 1101-1108.