

网络出版时间:2022-7-28 13:36 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220727.1756.011.html

沉默 lncRNA RNF185-AS1 通过靶向 miR-637/HMGA1 抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭

徐源, 杨杰, 姜健楠, 严章炜, 刘健, 向欣

摘要 目的 研究长链非编码 RNA (lncRNA) RNF185-AS1 调控微小 RNA-637 (miR-637) 对胶质瘤细胞增殖、侵袭的作用机制。方法 通过 GEPIA 数据库在线分析胶质瘤组织和癌旁组织中 RNF185-AS1 的表达水平。qRT-PCR 检测胶质瘤细胞系 (SNB-19、LN382、U87MG、U251) 和脑星型胶质正常细胞 HEB 中 RNF185-AS1 的表达水平。以 U251 细胞为研究对象, 分别转染 sh-Con 对照质粒 (sh-Con 组) 和 sh-RNF185-AS1 质粒 (sh-RNF185-AS1 组)。qRT-PCR 验证 RNF185-AS1 的沉默效率。MTT 实验和 Transwell 侵袭实验检测沉默 RNF185-AS1 后 U251 细胞增殖活力和侵袭情况。qRT-PCR 与双荧光素酶报告基因实验检测 RNF185-AS1 和 miR-637 的靶向关系。qRT-PCR 和 Western blot 检测高迁移率蛋白 A1 (HMGA1) 基因的表达。结果 胶质瘤组织中 RNF185-AS1 的表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。胶质瘤细胞系中 RNF185-AS1 的表达水平明显高于脑星型胶质正常细胞 ($P < 0.01$), U251 细胞中 RNF185-AS1 表达升高最明显 ($P < 0.01$)。与 sh-Con 组相比, sh-RNF185-AS1 组 U251 细胞中 RNF185-AS1 的表达水平显著下降 ($P < 0.01$), U251 细胞增殖活力明显降低 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数目明显较少 ($P < 0.01$)。RNF185-AS1 与 miR-637 存在互补结合的核苷酸序列 ($P < 0.01$)。与 sh-Con 组相比, sh-RNF185-AS1 组 U251 细胞中 miR-637 的表达水平明显增加 ($P < 0.01$), HMGA1 基因的表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论

RNF185-AS1 在胶质瘤组织和细胞系中高表达, 沉默 RNF185-AS1 通过靶向上调 miR-637 表达、下调 HMGA1 基因表达, 抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖和侵袭能力。

关键词 胶质瘤; RNF185-AS1; miR-637; 细胞增殖; 细胞侵袭

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1235-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.011

胶质瘤是发病率最高的中枢神经系统恶性肿瘤

2022-04-15 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2016YFC0106107);贵州省科技计划项目(编号:黔科合 2016 支撑 2905)

作者单位:贵州医科大学附属医院神经外科, 贵阳 550004

作者信息:徐源,男,副主任医师;

向欣,男,主任医师,博士,责任作者, E-mail: xxgzykdxfsyy2017@163.com

瘤,起源于神经外胚层的脑神经胶质细胞^[1]。胶质瘤呈现多灶发展,对放疗和化疗不敏感,且较易复发,因而胶质瘤患者的平均生存期较短,预后很差^[2]。探究胶质瘤细胞增殖、侵袭的分子机制对临床的分子靶向诊疗可能具有重要价值。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类没有蛋白编码潜能的单链 RNA,长度通常大于 200 个核苷酸^[3]。研究^[4]显示, lncRNA 在胶质瘤组织中高表达或表达缺失,能够促进或抑制胶质瘤细胞生长、侵袭,发挥癌基因或抑癌基因作用。RNF185-AS1 定位于染色体 22,是近年来新明确的一个 lncRNA, RNF185-AS1 在肝细胞癌中表现为癌基因作用,沉默 RNF185-AS1 能够抑制肝细胞癌的生长、转移^[5]。RNF185-AS1 在胶质瘤中的表达和作用并无相关报道。miR-637 是一种抑癌基因,过表达 miR-637 能够抑制骨肉瘤、肝癌、卵巢癌等肿瘤细胞的增殖、侵袭^[6]。该研究采用小干扰 RNA 沉默胶质瘤细胞中 RNF185-AS1 表达,明确其对胶质瘤细胞生长和侵袭的调控功能,探讨 miR-637 在此过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人脑星型胶质正常细胞系 HEB 和人胶质瘤细胞系 (SNB-19、LN382、U87MG、U251) 购自美国 ATCC 公司。Lipofectamine™ 3000 和 qRT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。DMEM/F12 培养基、胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司。pcDNA-sh-Con 对照质粒、miR-637 mimic、pcDNA-sh-RNF185-AS1 质粒 (AACAAGTCAATAATGACGGAGCCTCGAGGTTTAGGGTGGT)、miR-Con mimic、双荧光素酶报告基因载体 (野生型 pGL3-WT-RNF185-AS1 和突变型 pGL3-MUT-RNF185-AS1) 购自上海生工生物工程有限公司。Transwell 小室、基质胶、MTT 试剂盒购自美国 Corning 公司。双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国 Promega 公司。一抗兔源 HMGA1、 β -Tubulin、CDK3、Vimentin、N-Cadherin 购自美国 BD 公司,二抗羊抗兔抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 生物信息学方法 通过 GEPIA 数据库在线分析胶质瘤组织和癌旁组织中 RNF185-AS1 的表达水平。通过 linc2GO 数据库在线预测 RNF185-AS1 的靶基因, RNF185-AS1 和 miR-637 存在互补核苷酸序列。

1.3 细胞培养及转染 采用 DMEM/F12 培养基分别培养 HEB、U87MG、U251 细胞, 采用 RPMI 1640 培养基分别培养 SNB-19、LN382 细胞, 均含 10% 胎牛血清, 培养在 37 °C 恒温培养箱。本研究选取对数生长期 U251 细胞随机分为: sh-Con 组(转染 sh-Con 对照质粒)和 sh-RNF185-AS1 组(sh-RNF185-AS1 质粒), 根据 Lipofectamine™ 3000 转染试剂使用说明书进行转染。

1.4 qRT-PCR 检测 RNF185-AS1、miR-637 和 HMGA1 mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取脑星型胶质正常细胞系和胶质瘤细胞系总 RNA, 以逆转录后的 cDNA 为模版进行 qRT-PCR 反应。引物如下, RNF185-AS1 上游引物为 5'-GTCACATGTGGGTTTCCCCT-3', 下游引物为 5'-AACTGAACAAGCAGCCCTGT-3'; U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCA CA-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; miR-637 上游引物为 5'-ACUGGGGGCUUUCG GGCUCUGCGU-3', 下游引物为 5'-GCAGAGCCCG AAAGCCCCCAGU-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GGATTTGGTCTGTTTGGCG-3', 下游引物为 5'-CGGTGCCATGGAATTTGCC-3'; HMGA1 上游引物为 5'-AGCGAAGTGCCAACACCTAAG-3', 下游引物为 5'-GCCCCCTTGTTTCTTCT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 RNF185-AS1、miR-637 和 HMGA1 mRNA 相对表达水平, HMGA1 mRNA 和 RNF185-AS1 以 GAPDH 为内参, miR-637 以 U6 为内参。

1.5 MTT 法检测 U251 细胞的活力 分别将 sh-Con 组和 sh-RNF185-AS1 组 U251 细胞按照 150 μ l/孔(3×10^3 个)接种到 96 孔板。分别于接种 1、2、3、4、5 d, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 试剂 15 μ l。培养 3.5 h 后终止培养, 吸去上清液, 加入 140 μ l/孔的二甲基亚砜, 震荡 25 min, 保证结晶物溶解。酶联免疫检测仪波长设定为 490 nm, 分别测定各孔的吸光度(A)值。

1.6 Transwell 侵袭实验检测 U251 细胞侵袭能力 分别将 sh-Con 组和 sh-RNF185-AS1 组 U251 细胞采用不含血清的 DMEM/F12 培养基重悬, 将 200 μ l 细胞悬液(3×10^4 个)接种到铺有基质胶的 Transwell 上室, 加入 600 μ l 含血清的 DMEM/F12 培养

基至 Transwell 下室, 常规培养细胞。24 h 后用甲醇固定上室 40 min, 用 0.8% 的结晶紫染色 40 min, 棉签拭去未穿过基质胶和上室膜上层的 U251 细胞。倒置显微镜下随机选 7 个视野, 记录侵袭细胞数。

1.7 双荧光素酶报告基因检测 将构建的荧光素酶报告基因质粒(野生型 WT-RNF185-AS1 和突变型 MUT-RNF185-AS1)分别与 miR-Con 或 miR-637 共转染至 U251 细胞, 常规培养 48 h。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒的使用说明书, 检测每个共转染组 U251 细胞的相对荧光素酶活性。

1.8 Western blot 实验检测 HMGA1 蛋白及相关表型蛋白表达 RIPA 裂解液提取 sh-Con 组和 sh-RNF185-AS1 组蛋白样品, 配制 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白上样电泳。湿式转膜法转至硝酸纤维素膜, 用封闭液摇床孵育 3 h。加入一抗 HMGA1(1:1 000)、CDK3(1:2 000)、Vimentin(1:3 000)、N-Cadherin(1:2 000)、 β -Tubulin(1:2 000), 4 °C 孵育 15 h。封闭液洗膜 3 次, 加入二抗(1:5 000), 室温孵育 3 h。封闭液洗膜 3 次, 加入电化学显色试剂, 通过凝胶成像仪显色和拍照。

1.9 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织和细胞系中 RNF185-AS1 的表达水平 GEPIA 数据库在线分析显示(图 1), RNF185-AS1 在胶质瘤组织中相对表达显著高于癌旁组织($P < 0.01$)。qRT-PCR 结果显示(图 2), 与 HEB 细胞相比, 胶质瘤细胞中 RNF185-AS1 表达水平均明显增加($P < 0.01$), 选取 RNF185-AS1 表达水平最高的 U251 进行后续实验。

2.2 sh-RNF185-AS1 质粒的沉默效率 qRT-PCR 结果显示, sh-RNF185-AS1 组和 sh-Con 组 U251 细胞中 RNF185-AS1 表达分别为(1.17 ± 0.34)和(6.89 ± 0.29), 表明沉默 RNF185-AS1 的胶质瘤细胞系构建成功($P < 0.01$)。

2.3 沉默 RNF185-AS1 对 U251 细胞增殖的影响 MTT 法检测显示(图 3), 在接种细胞后 2、3、4、5 d, sh-RNF185-AS1 组 U251 细胞增殖活力均显著低于 sh-Con 组($P < 0.05$), 提示沉默 RNF185-AS1 抑制 U251 细胞的增殖活力。

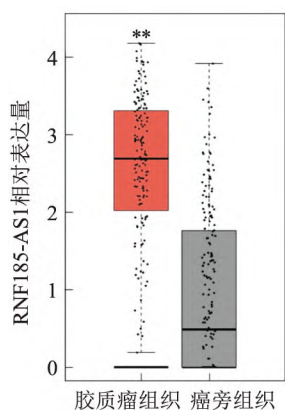


图1 胶质瘤组织和癌旁组织中 RNF185-AS1 的相对表达
与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

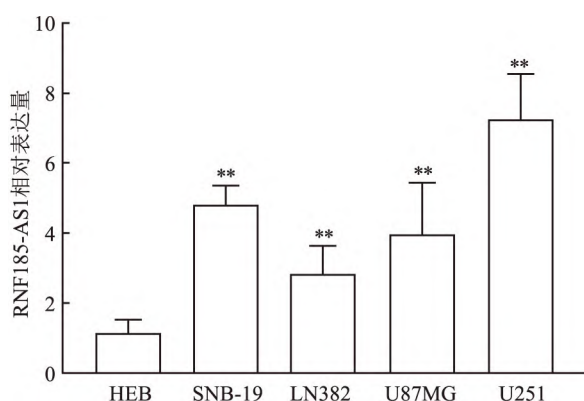


图2 胶质瘤细胞系和人脑星型胶质正常细胞中
RNF185-AS1 的相对表达
与 HEB 细胞比较: ** $P < 0.01$

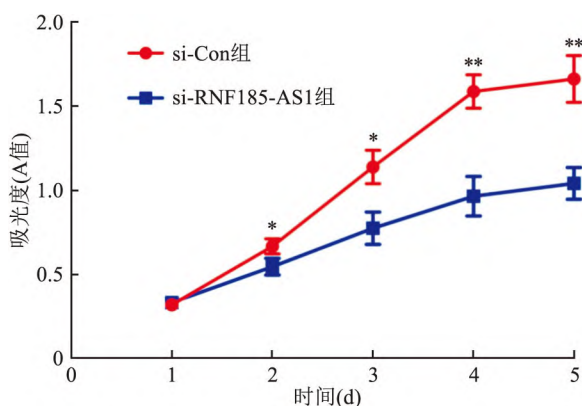


图3 沉默 RNF185-AS1 对 U251 细胞增殖活力的影响
与 si-Con 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 沉默 RNF185-AS1 对 U251 细胞侵袭的影响

Transwell 侵袭实验显示(图4), sh-RNF185-AS1 组和 sh-Con 组侵袭细胞数分别为 (48.78 ± 12.83) 个和 (172.81 ± 18.95) 个,与 sh-Con 组相比, sh-RNF185-AS1 组侵袭细胞数目显著减少($P < 0.01$),提示沉默 RNF185-AS1 抑制 U251 细胞的侵袭能力。

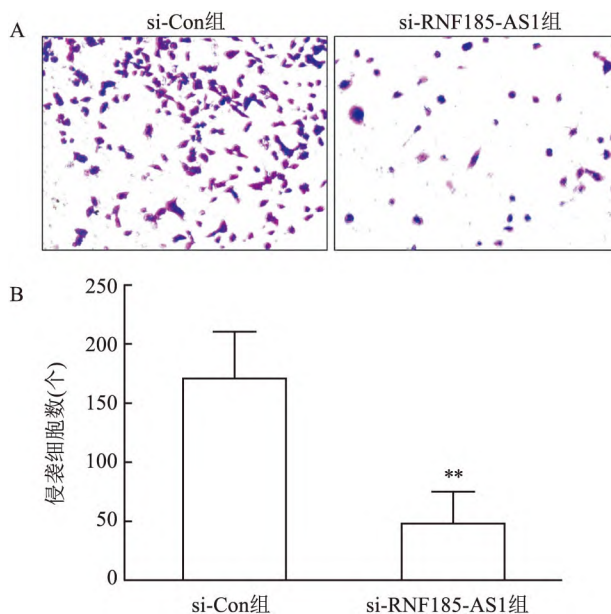


图4 沉默 RNF185-AS1 对 U251 细胞侵袭能力
的影响 结晶紫 $\times 100$

A: Transwell 侵袭实验; B: Transwell 侵袭实验定量分析; 与 sh-Con 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 RNF185-AS1 与 miR-637 的靶向结合作用

linc2GO 数据库预测显示(图5), RNF185-AS1 与 miR-637 存在部分连续互补的核苷酸序列。双荧光素酶报告基因检测显示(图6),转染野生型 WT-RNF185-AS1 后, miR-637 组的相对荧光素酶活性显著低于 miR-Con 组($P < 0.01$),表明 RNF185-AS1 的靶基因是 miR-637。



图5 RNF185-AS1 与 miR-637 特异性互补的核苷酸序列

2.6 沉默 RNF185-AS1 表达对 miR-637 和 HMGA1 mRNA 表达的调控作用

qRT-PCR 检测显示, sh-RNF185-AS1 组和 sh-Con 组 U251 细胞中 miR-637 表达分别为 (4.73 ± 0.47) 和 (1.07 ± 0.29) , sh-RNF185-AS1 组明显高于 sh-Con 组($P < 0.01$)。sh-RNF185-AS1 组和 sh-Con 组 U251 细胞中 HMGA1 mRNA 表达分别为 (0.99 ± 0.18) 和 (4.51 ± 0.73) , sh-RNF185-AS1 组明显低于 sh-Con 组($P < 0.01$),表明沉默 RNF185-AS1 能够靶向正调控 miR-637 表达,抑制 HMGA1 mRNA 表达。

2.7 沉默 RNF185-AS1 表达对 HMGA1 蛋白及相

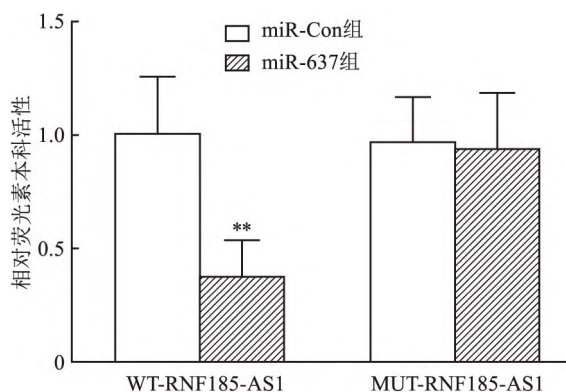


图6 双荧光素酶报告基因实验验证 RNF185-AS1 与 miR-637 的靶向结合
与 miR-Con 组比较: ** $P < 0.01$

关表型表达的影响 Western blot 检测显示(图7),沉默 RNF185-AS1 表达后, HMGA1 蛋白表达显著降低,细胞增殖表型蛋白 CDK3 表达降低,细胞侵袭表型蛋白 Vimentin、N-Cadherin 信号通路表达降低,表明 U251 细胞增殖能力和侵袭能力均降低。

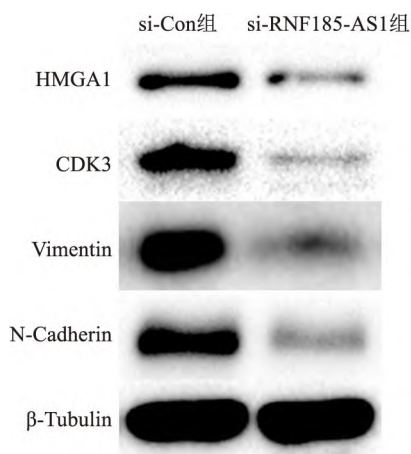


图7 沉默 RNF185-AS1 表达对 U251 细胞 HMGA1 蛋白及相关表型表达的影响

3 讨论

大量研究^[7]表明, lncRNA 的表达异常与胶质瘤的发生存在显著相关性,是胶质瘤血管生成、放疗抵抗、化疗抵抗的标志物。lncRNA 参与调节胶质瘤细胞的免疫反应、增殖活性、炎症反应、铁死亡等关键细胞过程,在胶质瘤中发挥细胞调节因子作用^[8]。lncRNA 如 NFIA-AS2 在胶质瘤组织中过度表达,其高表达与胶质瘤患者的不良预后密切相关,可能是无病生存期和总生存期的独立预后因素^[9]。如 TTN-AS1 在胶质瘤组织和细胞系中表达上调,沉默

TTN-AS1 表达能够抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭并加速细胞的凋亡^[10]。RNF185-AS1 是一个新型致癌作用的 lncRNA, Huang et al^[5] 研究显示, RNF185-AS1 在肝细胞癌组织和细胞系中高度表达,高水平 RNF185-AS1 与晚期 TNM 分期、远处转移和较差的总生存率相关,敲低 RNF185-AS1 通过结合并抑制 miR-221-5p,抑制肝细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭。本研究显示, RNF185-AS1 在胶质瘤组织和细胞系中高度表达,沉默 RNF185-AS1 能够显著抑制胶质瘤 U251 细胞的增殖活力和侵袭,表明 RNF185-AS1 在胶质瘤中发挥致癌基因的作用。

大量研究^[11]显示, lncRNA 能够阻断微小 RNA (miRNA) 在胶质瘤发生中的作用,恢复 miRNA 靶基因功能,从而调控胶质瘤的进展。如 lncRNA XIST 通过靶向 miR-133a 促进胶质瘤 U251 细胞的增殖、迁移、侵袭^[12]。如 lncRNA GAS5-AS1 通过靶向 miR-106b-5p 抑制胶质瘤 U87MG 和 U251 细胞的增殖、迁移、侵袭^[13]。本研究通过生物信息学分析显示, RNF185-AS1 可能在胶质瘤细胞中与 miR-637 互补结合。双荧光素酶报告基因实验进一步证实 RNF185-AS1 能够互补结合 miR-637。研究^[14]显示, miR-637 在胶质瘤组织中表达显著下调,过表达 miR-637 能够抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭。本研究通过 qRT-PCR 结果显示,沉默 RNF185-AS1 表达可上调胶质瘤 U251 细胞中 miR-637 的表达。以上结果表明, RNF185-AS1 直接靶向 miR-637 抑制胶质瘤的发生发展。高迁移率族蛋白 A1 (high mobility group A1, HMGA1) 是 miR-637 在胶质瘤细胞中的直接靶基因, miR-637 通过抑制 HMGA1 表达发挥抑癌基因作用^[15]。本研究显示,沉默 RNF185-AS1 表达后, HMGA1 基因表达降低,间接证明 RNF185-AS1 通过靶向 miR-637 调节 HMGA1 基因的表达。

参考文献

- [1] Xia P, Li Q, Wu G, et al. An Immune-Related lncRNA signature to predict survival in glioma patients[J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(2): 365-75.
- [2] Ye J, Zhu J, Chen H, et al. A novel lncRNA-LINC01116 regulates tumorigenesis of glioma by targeting VEGFA[J]. Int J Cancer, 2020, 146(1): 248-61.
- [3] Wu Y, Wei W, Tang L, et al. Prognostic potential of lncRNA RHPN1-AS1 in glioma[J]. Oncol Lett, 2020, 20(3): 2442-6.
- [4] Mu M, Niu W, Zhang X, et al. lncRNA BCYRN1 inhibits glioma tumorigenesis by competitively binding with miR-619-5p to regulate CUEDC2 expression and the PTEN/AKT/p21 pathway[J]. Oncogene, 2020, 39(45): 6879-92.
- [5] Huang C, Li K, Huang R, et al. RNF185-AS1 promotes hepatocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting miR-221-5p[J]. J Cell Biochem, 2021, 156(1): 1-12.

- cellular carcinoma progression through targeting miR-221-5p/integrin $\beta 5$ axis[J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118928.
- [6] Wen Y, Li B, He M, et al. circHIPK3 promotes proliferation and migration and invasion *via* regulation of miR-637/HDAC4 signaling in osteosarcoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(1): 169–79.
- [7] Li J, Liao T, Liu H, et al. Hypoxic glioma stem cell-derived exosomes containing linc01060 promote progression of glioma by regulating the MZF1/c-Myc/HIF1 α axis[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(1): 114–28.
- [8] Zhou X Y, Liu H, Ding Z B, et al. lncRNA SNHG16 exerts oncogenic functions in promoting proliferation of glioma through suppressing p21[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 1021–8.
- [9] Xin J, Zhao Y H, Zhang X Y, et al. lncRNA NFIA-AS2 promotes glioma progression through modulating the miR-655-3p/ZFX axis[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(4): 1273–80.
- [10] Chang K, Wang G, Lou J, et al. lncRNA TTN-AS1 upregulates RUNX1 to enhance glioma progression *via* sponging miR-27b-3p[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(3): 1064–74.
- [11] He Z, Long J, Yang C, et al. lncRNA DGCR5 plays a tumor-suppressive role in glioma *via* the miR-21/Smad7 and miR-23a/PTEN axes[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(20): 20285–307.
- [12] Luo C, Quan Z, Zhong B, et al. lncRNA XIST promotes glioma proliferation and metastasis through miR-133a/SOX4[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1641–8.
- [13] Huang W, Shi Y, Han B, et al. lncRNA GAS5-AS1 inhibits glioma proliferation, migration, and invasion *via* miR-106b-5p/TUSC2 axis[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(2): 416–26.
- [14] Zhang Q, Wang G, Xu L, et al. Long non-coding RNA LINC00473 promotes glioma cells proliferation and invasion by impairing miR-637/CDK6 axis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3896–903.
- [15] Zeng Y, Que T, Lin J, et al. Oncogenic ZEB2/miR-637/HMGA1 signaling axis targeting vimentin promotes the malignant phenotype of glioma[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 769–82.

Silencing the expression of lncRNA RNF185-AS1 inhibits the proliferation and invasion of glioma cells by targeting miR-637/HMGA1

Xu Yuan, Yang Jie, Jiang Jiannan, Yan Zhangwei, Liu Jian, Xiang Xin

(Dept of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To study the mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) RNF185-AS1 affecting the proliferation and invasion of glioma cells by regulating microRNA-637 (miR-637). **Methods** The GEPIA database was used to analyze the expression level of RNF185-AS1 in glioma tissues and adjacent tissues. qRT-PCR was used to detect the expression level of RNF185-AS1 in glioma cell lines (SNB-19, LN382, U87MG, U251) and normal brain astrocytes HEB. U251 cells were used as the research object, and sh-Con control plasmid (sh-Con group) and sh-RNF185-AS1 plasmid (sh-RNF185-AS1 group) were transfected respectively. qRT-PCR verified the silencing efficiency of RNF185-AS1. MTT experiment and Transwell invasion experiment were used to detect the proliferation and invasion of U251 cells after silencing RNF185-AS1. qRT-PCR and dual luciferase reporter gene experiment were used to detect the targeting relationship between RNF185-AS1 and miR-637. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of high mobility group A1 (HMGA1) gene. **Results** The expression level of RNF185-AS1 in glioma tissue was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.01$). The expression level of RNF185-AS1 in the glioma cell line was significantly higher than that in normal brain astrocytes ($P < 0.01$), and the expression of RNF185-AS1 in U251 cells increased the most significantly ($P < 0.01$). Compared with the sh-Con group, the expression level of RNF185-AS1 in U251 cells in the sh-RNF185-AS1 group significantly decreased ($P < 0.01$), the proliferation activity of U251 cells was significantly reduced ($P < 0.05$), and the number of invaded cells was significantly less ($P < 0.01$). RNF185-AS1 and miR-637 had complementary nucleotide sequences ($P < 0.01$). Compared with the sh-Con group, the expression level of miR-637 in U251 cells in the sh-RNF185-AS1 group significantly increased ($P < 0.01$), and the expression level of HMGA1 gene was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** RNF185-AS1 is highly expressed in glioma tissues and cell lines. Silencing RNF185-AS1 can inhibit the proliferation and invasion of glioma U251 cells by targeting up-regulation of miR-637 expression and down-regulation of HMGA1 gene expression.

Key words glioma; RNF185-AS1; miR-637; cell proliferation; cell invasion