

RNPC1 通过抑制 Snail 表达影响乳腺癌转移

吴 靓,周旭婕,李小霞,石 靓,丁 强*

(南京医科大学第一附属医院乳腺外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究人乳腺癌细胞 BT474 中 RNPC1 对 Snail 表达的调控,及其与乳腺癌淋巴结转移等生物学行为的关系。方法:采用免疫组化(SP法)检测 42 例伴有淋巴结转移及 39 例无淋巴结转移的乳腺癌组织中 RNPC1 蛋白的表达,并计算差值;通过 TCGA 数据库分析伴有或不伴有淋巴结转移的乳腺癌组织中 RNPC1 基因表达差异;采用慢病毒转染法干扰或过表达 RNPC1 基因,实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 法检测 BT474 细胞中 Snail 的表达量;以双荧光素酶报告基因实验证实 RNPC1 与靶基因 Snail 的结合。结果:与有淋巴结转移的乳腺癌组织相比,RNPC1 的表达量在无淋巴结转移的组织中相对较高;干扰 RNPC1 能够明显增加 BT474 细胞中 Snail 的表达,过表达 RNPC1 可以显著降低 Snail 的表达;RNPC1 通过结合 Snail 3'-非编码区(3'-UTR)降低其表达水平。结论:RNPC1 可以通过降低 Snail 的表达,影响乳腺癌的转移能力。

[关键词] RNPC1;乳腺肿瘤;淋巴结转移;Snail

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-938-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170804

RNPC1 inhibits breast cancer metastasis via down-regulating Snail

Wu Jing, Zhou Xujie, Li Xiaoxia, Shi Liang, Ding Qiang*

(Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory mechanism of RNPC1 on the expression of Snail family transcriptional repressor 1 (Snail) in BT474 breast cancer cells and the possible role of RNPC1 in breast cancer lymph node metastasis. **Methods:** Immunohistochemical (IHC) staining was used to detect and compare the expression of RNPC1 in 42 cases of breast cancer tissues with lymph node metastasis and 39 cases without lymphatic metastasis. The difference of RNPC1 gene level in breast cancer tissues with or without lymph node metastasis was calculated via utilizing TCGA database. The expression of RNPC1 in BT474 cells was knocked down or induced by lentiviral vector, and the effect was identified by qRT-PCR and Western blot. Dual-luciferase activity assay was applied to test and verify the target gene of RNPC1. **Results:** Compared with breast cancer tissues with lymph node metastasis, expression of RNPC1 was significantly higher in those without lymph node metastasis. The qRT-PCR and Western blot results showed that knock-down of RNPC1 in BT474 cells up-regulated Snail levels, whereas overexpression of RNPC1 resulted in down-regulation of Snail expressions. The dual-luciferase activity assay confirmed that 3'-untranslated region (3'-UTR) was required for RNPC1 to decrease the expression of Snail. **Conclusion:** Our findings suggested that RNPC1 might inhibit breast cancer metastasis via targeting Snail.

[Key words] RNPC1; breast cancer; lymph node metastasis; Snail

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):938-942]

淋巴结转移是乳腺癌的重要转移途径,是否伴有淋巴结转移在判断乳腺癌患者临床分期、评估预后及指导治疗方面具有重要意义。据研究报道,转录因子 Snail 在乳腺癌^[1]、肺癌^[2]、胃癌^[3]、结直肠癌^[4]等

多种肿瘤中与淋巴结转移有着密切关系,进而影响患者生存及预后。

RNPC1 是一种 RNA 结合蛋白,定位于染色体 20q13 上,主要通过结合 3'-非编码区(3'-UTR)的 AU 富含原件(AREs),调节靶基因 mRNA 稳定性,在转录后调节基因表达水平,从而发挥多种生物学功能^[5-6]。既往研究显示,RNPC1 在乳腺癌中发挥抑癌作用,具有抑制乳腺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力

[基金项目] 国家自然科学基金目(81572595)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:dingqiang@njmu.edu.cn

的重要功能^[7-8]。

为进一步研究 RNPC1 对乳腺癌淋巴结转移的影响及其调节机制,本研究使用组织芯片技术结合癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库分析,检测乳腺癌组织中 RNPC1 的表达,并将外源性 RNPC1 基因稳转入人乳腺癌细胞株 BT474,观察其对 Snail mRNA 及蛋白表达的影响,从而进一步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

乳腺癌组织芯片(BR1101,西安艾丽娜公司);人乳腺癌细胞株 BT474 由南京医科大学第一附属医院乳腺外科实验室保存;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS, Gibco 公司,美国),青霉素、链霉素(Hyclone 公司,美国);人源 RNPC1 基因过表达及干扰载体构建和病毒包装(上海诺百公司);慢病毒转染试剂(上海吉玛公司);TRIzol、Prime Script RT Reagent 试剂(TaKaRa 公司,日本),FastStart Universal SYBR Green Master 试剂(Roche 公司,瑞士),引物合成(Invitrogen 公司,美国);蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),RNPC1 抗体(Santa Cruz 公司,美国),Snail 抗体、 β -actin 抗体(Cell Signal Technology 公司,美国);荧光素酶报告试剂盒(Promega 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化(SP 法)

组织芯片中所选取的乳腺癌组织均来自乳腺浸润性导管癌患者,所有组织在采集时均遵循最高的道德标准,获得知情同意及伦理委员会同意。将组织芯片脱蜡水化后,使用柠檬酸缓冲溶液(pH6.0)高温高压进行抗原修复,RNPC1(1:300)4℃孵育过夜;二抗室温孵育 30 min;滴加二氨基联苯胺,苏木素复染,乙醇脱水,树胶封片,显微镜下读片。免疫组化染色结果以染色强度和阳性细胞比例综合判断。①染色强度:无染色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分;②阳性细胞比例:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞比例 1%~10%为 1 分,11%~50%为 2 分,51%~80%为 3 分,81%~100%为 4 分。两项评分之积 ≤ 7 分为低表达, ≥ 8 分为高表达。

1.2.2 TCGA 乳腺癌数据获取及分析

从 TCGA 数据库(<http://cancergenome.nih.gov/>)选取乳腺癌基因组表达数据及临床数据进行下载,共提取 385 例无淋巴结转移的乳腺癌组织及 406 例有淋巴结转移的乳腺癌组织,分析 RNPC1 的表达。

1.2.3 细胞培养

人乳腺癌细胞株 BT474 在含 10%FBS、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2.4 细胞转染及筛选

对数生长期 BT474 细胞于转染前 24 h 接种于 6 孔板中(2.5 $\times 10^5$ 个/孔),待细胞贴壁,覆盖率达 50%时进行转染,参照慢病毒转染说明书将干扰 RNPC1 及其对照组慢病毒、过表达 RNPC1 及其对照组慢病毒分别转染入 BT474 细胞。待细胞融合度达 70%~80%时,加入 2 μ g/mL 嘌呤霉素培养,逐渐增大筛选浓度至 3 μ g/mL 培养 2 周,筛选出抗性克隆细胞株扩大培养。

1.2.5 RNA 提取与实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

取对数生长期的各组细胞,使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,Primescript RT Reagent 逆转录合成 cDNA。RNPC1 的引物为:上游 5'-ACGCCTCGCTCAGGAAGTA-3',下游 5'-GTCTTTGCAAGCCCTCTCAG-3';Snail 的引物:上游 5'-TTACCTTCCAGCAGCCCTAC-3',下游 5'-AGCCTTTCCACTGTCTCCTC-3'; β -actin 的引物:上游 5'-GCTGTGCTATCCCTGTACGC-3',下游 5'-TGCCTCAGGGCAGCGGAACC-3'。使用 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂进行扩增,反应程序为:95℃预变性 10 min;95℃变性 15 s,60℃退火 15 s,进行 40 个循环。以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 值表示目的基因的相对表达量。

1.2.6 蛋白提取及 Western blot

依据蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,聚偏氟乙烯(PVDF)膜进行转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别予 RNPC1、Snail、 β -actin 抗体 4℃孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,使用 ECL 化学发光显色,并采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度值分析。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验

BT474 细胞接种于 24 孔板(1.0 $\times 10^5$ 个/孔),24 h 后将 200 ng 携带 Snail 3'-UTR 区段的 PGL3 荧光素酶报告载体及 10 ng 海参内参质粒共转染 BT474 细胞,48 h 后裂解细胞,参照荧光素酶报告试剂盒说明书检测荧光素酶活性差异。

1.3 统计学方法

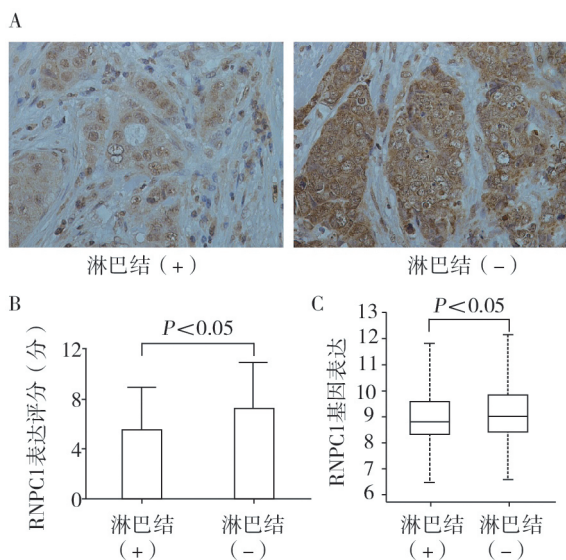
所有实验均重复 3 次,运用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用百分比表示,采用 χ^2

检验。P≤0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 RNPC1 与淋巴结转移的关系

在无淋巴结转移的 39 例乳腺癌组织中,RNPC1 呈高表达的 19 例,在有淋巴结转移的 42 例乳腺癌组织中 RNPC1 呈高表达的 11 例,RNPC1 蛋白在无淋巴结转移的乳腺癌组织中表达明显高于有淋巴结转移者(P<0.05,图 1A、B),而与患者年龄、TNM 分期及病理分级均无关(表 1)。通过 TCGA 数据库分析 385 例无淋巴结转移的乳腺癌组织及 406 例有淋巴结转移的乳腺癌组织,RNPC1 在无淋巴结转移组表达高于有淋巴结转移组(P<0.05,图 1C)。



A:免疫组化检测 RNPC1 在淋巴结转移组和未转移组乳腺癌组织中的表达(×400);B:免疫组化染色后 RNPC1 表达评分比较;C:通过 TCGA 数据库分析 RNPC1 的表达差异。

图 1 RNPC1 在乳腺癌组织中的表达

Figure 1 Expression of RNPC1 in breast cancer tissues

2.2 转染效果验证

慢病毒转染人乳腺癌 BT474 细胞 48 h,荧光显微镜下观察可见荧光表达,在嘌呤霉素作用下可见部分细胞死亡,继续加嘌呤霉素培养 2 周,筛选出稳定表达目的基因的细胞株。

2.3 各组 BT474 细胞中 RNPC1 和 Snail mRNA 的表达

qRT-PCR 检测结果显示,干扰 RNPC1 组与干扰对照组 BT474 细胞中 RNPC1 mRNA 的相对表达量分别为 0.312 ± 0.019 和 1.005 ± 0.067 ,Snail mRNA 的相对表达量分别为 1.407 ± 0.043 和 1.001 ± 0.033 ,干扰 RNPC1 组与干扰对照组中 RNPC1 及

表 1 乳腺癌组织中 RNPC1 的表达与临床病理学特征的关系

Table 1 Expression of RNPC1 and its correlation with clinicopathological characteristics in breast cancer tissues

临床病理特征	例数	RNPC1 表达 [n(%)]		P 值
		低表达	高表达	
年龄(岁)				0.315
<50	41	28(69.05)	13(30.95)	
≥50	40	23(58.14)	17(41.86)	
病理分级				0.828
I~II	61	38(62.30)	23(37.70)	
III	20	13(65.00)	7(35.00)	
TNM 分期				0.751
I~II	61	39(63.93)	22(36.07)	
III	20	12(60.00)	8(40.00)	
淋巴结转移				0.036
有	42	31(74.42)	11(25.58)	
无	39	20(52.38)	19(47.62)	

Snail mRNA 表达差异有统计学意义 (P< 0.05,图 2A)。过表达 RNPC1 组与过表达对照组 BT474 细胞中 RNPC1 mRNA 的相对表达量分别为 4.396 ± 0.074 和 1.001 ± 0.034 ,Snail mRNA 的相对表达量分别为 0.718 ± 0.037 和 1.004 ± 0.062 。过表达 RNPC1 组与过表达对照组中 RNPC1 及 Snail mRNA 表达差异也有统计学意义(P< 0.05,图 2B)。

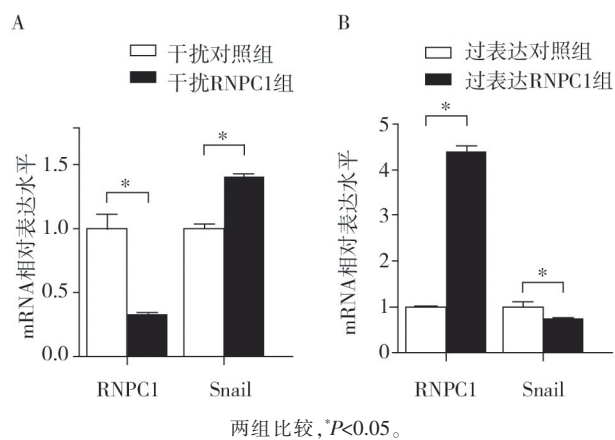


图 2 qRT-PCR 检测转染 RNPC1 慢病毒后 RNPC1 和 Snail 的表达水平

Figure 2 mRNA expressions of RNPC1 and Snail after lentiviral transfection

2.4 各组 BT474 细胞中 RNPC1 和 Snail 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示,在人乳腺癌细胞 BT474 中敲除 RNPC1,Snail 蛋白表达较对照组明显升高(P<0.05,图 3A);而过表达 RNPC1 后,Snail 蛋白表达降低(P<0.05,图 3B)。

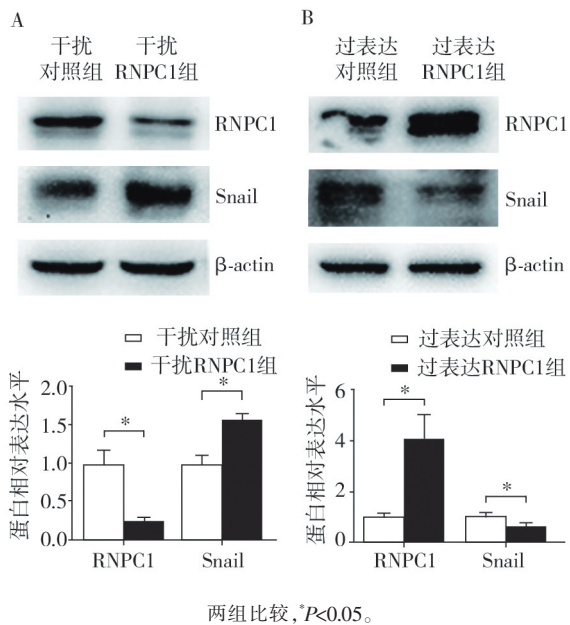
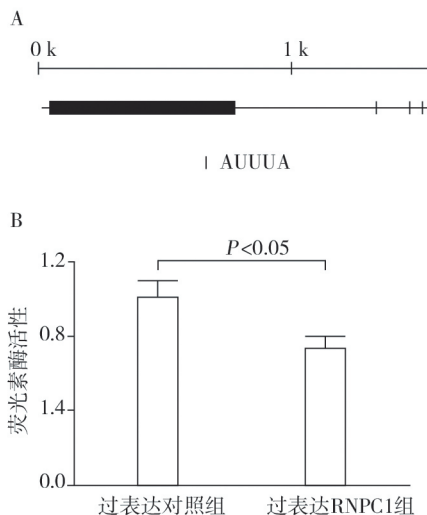


图 3 Western blot 检测转染 RNPC1 慢病毒后 RNPC1 和 Snail 的蛋白水平

Figure 3 Protein levels of RNPC1 and Snail after lentiviral transfection

2.5 双荧光素酶报告基因实验结果

通过 AREsite 分析发现 Snail 3'-UTR 区域存在 RNPC1 的可能结合位点(图 4A),即 AU 富含区,双荧光素酶报告基因结果显示,过表达 RNPC1 组较对照组而言,相对荧光素酶活性明显抑制($P < 0.05$,图 4B),这一结果说明 RNPC1 通过结合 Snail 3'-UTR 区降低其表达水平。



A:Snail 3'-UTR 区域的结构模式图;B:分别转入报告基因质粒后过表达 RNPC1 组与过表达对照组荧光素酶活性比较。

图 4 RNPC1 与 Snail 3'-UTR 区域存在结合位点

Figure 4 RNPC1 binds to Snail 3'-UTR

3 讨论

目前,乳腺癌已成为我国女性发病率最高的癌症,其复发和转移是导致乳腺癌患者死亡的主要原因,淋巴结转移是乳腺癌最常见的转移途径,其存在是判断预后最重要的指标,并可用于指导局部及全身治疗^[9]。因此,如何检测和控制淋巴结转移在乳腺癌的防治过程中有着重要意义。Snail 作为锌指转录因子家族成员之一,可以直接作用于细胞黏附分子 E-cadherin 并抑制其表达^[10],从而降低细胞间的黏附力,使肿瘤细胞更易从原发灶脱离,获得较强的侵袭及转移能力。Cao 等^[11]发现乳腺癌中过度表达的 Snail 蛋白与淋巴结转移密切相关。Markiewicz 等^[12]研究发现,相较于肿瘤原发灶,Snail 在乳腺癌淋巴结转移灶中表达量更高,淋巴结转移灶中高表达的 Snail 与更短的总生存期及无病生存期密切相关。因此 Snail 的表达与乳腺癌的淋巴结转移有着重要联系,研究 Snail 的表达调控机制有着至关重要的意义。

RNPC1 作为 RNA 结合蛋白家族成员之一,主要通过转录后调节影响靶基因的表达,包括:多聚腺苷酸化作用、mRNA 剪接及运输、RNA 稳定性的调节及对翻译的调控^[13]。已有研究证实,RNPC1 在乳腺癌中可以发挥抑癌作用,与细胞周期调控及肿瘤细胞的迁移侵袭关系密切^[7]。并可通过结合雌激素受体(ER)及孕激素受体(PR)的 3'-UTR 上 AU 富含区而增加 ER、PR 的稳定性,从而调节其表达^[14-15]。Snail mRNA 的 3'-UTR 亦存在富含 AU 元件的区域,很可能含有 RNPC1 的潜在结合位点。

本研究中,通过比较伴有或不伴有淋巴结转移的乳腺癌组织中 RNPC1 的表达,发现 RNPC1 在有淋巴结转移的乳腺癌组织中表达相对较低。通过数据库分析,进一步证实了上述结果。为进一步研究 RNPC1 影响乳腺癌淋巴结转移的机制,将过表达和敲除 RNPC1 基因的慢病毒转入人乳腺癌细胞株 BT474 中,采用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测,结果显示 RNPC1 可以下调 Snail mRNA 及蛋白的表达。双荧光素酶报告基因实验证实,RNPC1 与 Snail 3'-UTR 的 AU 富含区存在结合关系。由此,得出结论:RNPC1 可以通过结合 Snail 3'-UTR 区域下调其表达,进而影响乳腺癌的淋巴结转移,而其中是否存在其他分子的参与,其调节机制如何,还有待进一步研究。

综上所述 RNPC1 在乳腺癌的发生发展中有着重要作用,随着对 RNPC1 的靶基因及其上游调控因

子的进一步研究,RNPC1 可能成为判断乳腺癌预后以及指导诊断治疗的一个新的重要分子。

[参考文献]

- [1] Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas[J]. *Oncogene*, 2002, 21(20):3241-3246
- [2] 李娟,涂媛,蒋莉莉,等. Snail 和 Claudin-3 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *中国肿瘤杂志*, 2012, 15(10):583-590
- [3] Shin NR, Jeong EH, Choi CI, et al. Overexpression of snail is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:521
- [4] Fan XJ, Wan XB, Yang ZL, et al. Snail promotes lymph node metastasis and twist enhances tumor deposit formation through epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(2):173-180
- [5] Cho SJ, Zhang J, Chen X. Rnpc1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(7):2256-2267
- [6] Xu E, Zhang J, Chen X. MDM2 expression is repressed by the RNA-binding protein RNPC1 via mRNA stability[J]. *Oncogene*, 2013, 32(17):2169-2178
- [7] Xue JQ, Xia TS, Liang XQ, et al. RNA-binding protein rnpc1: Acting as a tumor suppressor in breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:322
- [8] Xue JQ, Liang XQ, Cheng L, et al. In vitro study of the effects of RNA binding motif protein 38 expression on the biological behavior of human breast cancer BT474 cells[J]. *Chin J Exp Surg*, 2014, 31(5):929-931
- [9] Caudle AS, Kuerer HM. Targeting and limiting surgery for patients with node-positive breast cancer [J]. *BMC Med*, 2015, 13:149
- [10] Batlle E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2):84-89
- [11] Cao YW, Wan GX, Sun JP, et al. Implications of the notch1-snail/slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(2):70-76
- [12] Markiewicz A, Ahrends T, Welnicka-Jaskiewicz M, et al. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:226
- [13] Krecic AM, Swanson MS. Hnmp complexes: Composition, structure, and function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(3):363-371
- [14] Shi L, Xia TS, Wei XL, et al. Estrogen receptor (ER) was regulated by RNPC1 stabilizing mRNA in ER positive breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(14):12264-12278
- [15] Lou PP, Li CL, Shi L, et al. RNPC1 enhances progesterone receptor functions by regulating its mRNA stability in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10):16387-16400

[收稿日期] 2017-02-03

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmunjmuedu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。