

RNPC1 基因对乳腺癌细胞 MCF-7 阿霉素药物敏感性的影响

周旭婕, 吴 靓, 朱 磊, 孙 茜, 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 RNPC1 对乳腺癌细胞 MCF-7 阿霉素药物敏感性的影响。方法: 在 MCF-7 细胞中使用慢病毒转染法, 设敲除(shRNPC1)组和过表达 RNPC1 组、敲除对照(SCR)组和过表达对照(NC)组。用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测各组 MCF-7 细胞中 RNPC1 的 mRNA 和蛋白水平。以不同浓度的阿霉素处理各组 MCF-7 细胞, CCK-8 法检测各组细胞生长抑制率。阿霉素处理各组 MCF-7 细胞后, 用流式细胞术检测各组细胞凋亡率, Western blot 法检测各组细胞中凋亡相关蛋白的表达。结果: shRNPC1 组 RNPC1 mRNA 和蛋白相对表达量均低于 SCR 组, 过表达 RNPC1 组 RNPC1 mRNA 及蛋白相对表达量均高于 NC 组 ($P < 0.05$)。阿霉素处理各组 MCF-7 细胞后, shRNPC1 组 IC_{50} 明显低于 SCR 组 ($P < 0.05$), 过表达组 IC_{50} 明显高于 NC 组 ($P < 0.05$)。阿霉素处理各组 MCF-7 细胞 24 h 后, 发现 shRNPC1 组凋亡率明显高于 SCR 组; 过表达 RNPC1 组凋亡率显著低于 NC 组 ($P < 0.05$)。阿霉素处理各组 MCF-7 细胞 24 h 后, shRNPC1 组抑凋亡蛋白 BCL-XL、BCL-2 的表达低于 SCR 组, 促凋亡蛋白 BIM 和 BID 的表达高于 SCR 组; 过表达 RNPC1 组抑凋亡蛋白 BCL-XL、BCL-2 的表达高于 NC 组, 促凋亡蛋白 BIM 和 BID 的表达低于 NC 组。结论: RNPC1 能降低乳腺癌细胞 MCF-7 对阿霉素的敏感性, 其机制与抗细胞凋亡有关。

[关键词] RNPC1; 乳腺癌; 阿霉素; 药物敏感性

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1099-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170906

Effects of RNPC1 on the sensitivity of breast cancer cell MCF-7 with doxorubicin

Zhou Xujie, Wu Jing, Zhu Lei, Sun Xi, Ding Qiang*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of RNPC1 on the sensitivity of breast cancer cell MCF-7 with doxorubicin (DOX). **Methods:** Lentivirus was used to over-express and knock-down RNPC1 in the MCF-7 breast cancer cells. The cells were divided into overexpress RNPC1(RNPC1) group and its control(NC group), knock-down RNPC1(shRNPC1 group) and its control(SCR group). The relative mRNA and protein expression of RNPC1 was detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. The experimental groups were treated with different concentration of DOX, and cell growth inhibition rate was tested cell counting kit 8(CCK-8). After the experimental groups was treated with DOX, cell apoptosis rate was analysis by flow cytometer assay and the expression of apoptosis-related protein was detected by Western blot assay. **Results:** The qRT-PCR and Western blot results showed that the mRNA and protein level of RNPC1 was increased after transfection with RNPC1 overexpression(RNPC1). While, RNPC1 was reduced after transfection with knockdown RNPC1 (shRNPC1) lentivirus. After treatment with different concentration of DOX, the IC_{50} of shRNPC1 group was significantly lower than SCR group ($P < 0.05$). Furthermore, the IC_{50} of RNPC1 group was higher than NC group ($P < 0.05$). The flow cytometer assay was used after treatment with DOX for 24 h in the experimental groups. The cell apoptosis rate of shRNPC1 group was higher than SCR group, while, the cell apoptosis rate of RNPC1 was lower than NC group. Overexpression of RNPC1 increased the expression of BCL-XL and BCL-2 after treatment with DOX. Reversely, knockdown of RNPC1 reduced the expression of BCL-XL and BCL-2. Furthermore, overexpression of RNPC1 reduced the expression of BIM and BID after treatment with DOX. While, knockdown of RNPC1 increased the expression of BIM and BID. **Conclusion:** RNPC1 could decrease the sensitivity of breast cancer cell MCF-7 to DOX, and the underlying mechanism might be related to cell apoptosis.

[Key words] RNPC1; breast cancer; doxorubicin; drug sensitivity

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1099-1103]

[基金项目] 国家自然科学基金(81572595)

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

RNPC1(RNA-binding region-containing protein 1)是近年来发现的与肿瘤发生发展密切相关的基因。RNPC1是p53家族的重要靶点,可以通过调节靶基因mRNA的稳定性进而发挥一系列生物学作用^[1]。RNPC1可以调节p21的mRNA稳定性进而影响细胞周期,同时也可以通过调节HuR的mRNA稳定性影响细胞增殖^[2-3]。RNPC1主要通过识别目标基因的3'-非编码区的富含AU元件区(AREs)来调节基因的稳定性^[3]。小鼠成瘤实验表明,RNPC1可以通过影响乳腺癌重要标志物孕激素受体(progesterone receptor,PR)的mRNA稳定性,从而调控乳腺癌细胞的增殖^[4]。同时RNPC1也可以影响HER-2的表达进而影响细胞对曲妥珠单抗的药物敏感性^[5]。阿霉素等蒽环类药物是临床常用的抗癌药物,具有很强的抗癌活性,化疗耐药是乳腺癌治疗面临的一个重大问题^[6],发现新的治疗靶点有助于增强疗效。本研究在MCF-7细胞系中敲低和过表达RNPC1,观察细胞生长抑制率和凋亡相关蛋白的变化,探讨RNPC1对化疗药阿霉素敏感性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM(Gibco公司,美国),青霉素和链霉素(HyClone公司,美国)。阿霉素(上海生物工程股份有限公司)。慢病毒转染试剂(上海吉玛公司),Prime Script RT Reagent试剂盒和RNA Trizol(TaKaRa公司,日本),FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)试剂(Roche公司,瑞士)。RNPC1抗体(Santa Cruz公司,美国),BCL-XL、BIM、BID抗体(Cell Signal Technology公司,美国);BCL-2抗体(上海碧云天公司)。细胞计数试剂盒(cell counting kit,CCK8,Dojindo公司,日本),细胞凋亡试剂盒(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物准备

乳腺癌细胞株MCF-7(由南京医科大学第一附属医院普外科乳腺外科实验室保存)在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM培养液,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。阿霉素溶于无菌蒸馏水中,配成10 mg/mL原液储存,使用时用培养基稀释。

1.2.2 细胞转染和筛选

待MCF-7细胞生长至对数期,细胞融合至70%~80%时,将细胞接种于6孔板中。24 h后细胞充分贴

壁,覆盖率达40%~50%时进行转染。参照慢病毒转染试剂说明,将过表达RNPC1及其对照组慢病毒(NC)、干扰RNPC1(shRNPC1)及其对照组(SCR)慢病毒分别转入MCF-7细胞。转染48 h后,荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况,融合度达70%~80%时,加入3 μ g/mL嘌呤霉素培养,筛选稳定株后扩大培养。

1.2.3 实时荧光定量PCR法检测各组MCF-7细胞中RNPC1的表达

收集对数生长期细胞,按照TRIzol试剂提取说明书提取各组MCF-7细胞总RNA,逆转录合成cDNA。引物均来自上海英俊生物技术有限公司,内参 β -actin的上游引物序列为5'-GCTGTGCTATCCCTGTACGC-3',下游引物序列为5'-TGCCTCAGGGCAGCGGAACC-3'。RNPC1的上游引物序列为5'-ACGCCTCGCTCAGG AAGTA-3',下游引物序列为5'-GTCTTTGCAAGCC-CTCTCAG-3'。使用SYBR Premix Ex Taq试剂扩增,反应总体系为20 μ L,灭菌蒸馏水7.2 μ L。反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,共40个循环。以2^{- $\Delta\Delta$ CT}值代表RNPC1基因的相对表达量。

1.2.4 Western blot法检测各组MCF-7细胞中RNPC1和凋亡相关蛋白的表达量

分别收集各组细胞,蛋白提取试剂盒提取总蛋白。加入5 \times 蛋白上样缓冲液,煮沸5 min,使蛋白充分变性。取等量蛋白和蛋白标记上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将电泳产物转移至PVDF膜上,牛奶封闭2 h,加入RNPC1、BCL-XL、BID、BIM抗体,4 $^{\circ}$ C慢摇孵育过夜。次日TBST洗膜3次,每次8 min,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG和兔抗小鼠IgG室温孵育2 h,洗膜3次,每次8 min,显影。

1.2.5 CCK-8法检测不同阿霉素处理后各组MCF-7细胞的IC₅₀

取对数生长期细胞,胰酶消化制成细胞悬液,计数后以5 000个/孔接种于96孔板,每组3个复孔,设置空白对照组。24 h后细胞完全贴壁,在shRNPC1组和SCR组分别加入0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μ g/mL的阿霉素,RNPC1过表达组和NC组分别加入0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 μ g/mL阿霉素。细胞培养24 h后撤去药物,每孔加入10%的CCK-8溶液,培养箱中孵育2 h,酶标仪450 nm波长处测量每孔吸光度值,计算各组细胞IC₅₀。

1.2.6 流式细胞术检测阿霉素处理各组MCF-7细胞的凋亡率

取对数生长期的各组MCF-7细胞,制成细胞悬

液,计数后 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板。待 24 h 贴壁后,加入 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 阿霉素,作用 24 h 后撤药。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,细胞用 PBS 洗 2 遍后,每管加入 $100 \mu\text{L}$ 的 Binding Buffer 和 $3 \mu\text{L}$ 的 APC,避光孵育 10 min,最后加入 0.2 mg DAPI 避光孵育 5 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件分析数据,所有试验结果重复 3 次。两组间采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MCF-7 细胞中 RNPC1 mRNA 和蛋白表达

实时荧光定量 PCR 结果显示,shRNPC1 组和 SCR 组中 RNPC1 mRNA 的相对表达量分别为 0.09 ± 0.01 和 1.06 ± 0.09 ($P < 0.05$);过表达 RNPC1 组和 NC 组 RNPC1 mRNA 的相对表达量分别为 3.72 ± 0.39 和 1.05 ± 0.07 ($P < 0.05, n = 3$, 图 1)。shRNPC1 组 RNPC1 蛋白表达量明显低于 SCR 组,同时过表达 RNPC1 组 RNPC1 蛋白表达量明显高于 NC 组(图 2)。

2.2 检测各组细胞阿霉素的敏感性

CCK-8 检测结果显示,不同浓度阿霉素作用于各组细胞 24 h 后,shRNPC1 组的抑制率明显高于 SCR 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A);过表

达 RNPC1 组的抑制率明显低于 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$, 图 3B)。shRNPC1 组、SCR 组、NC 组和过表达 RNPC1 组 IC_{50} 分别为 $(0.30 \pm 0.03) \mu\text{g/mL}$ 、 $(1.12 \pm 0.10) \mu\text{g/mL}$ 、 $(2.01 \pm 0.02) \mu\text{g/mL}$ 和 $(3.15 \pm 0.13) \mu\text{g/mL}$ 。

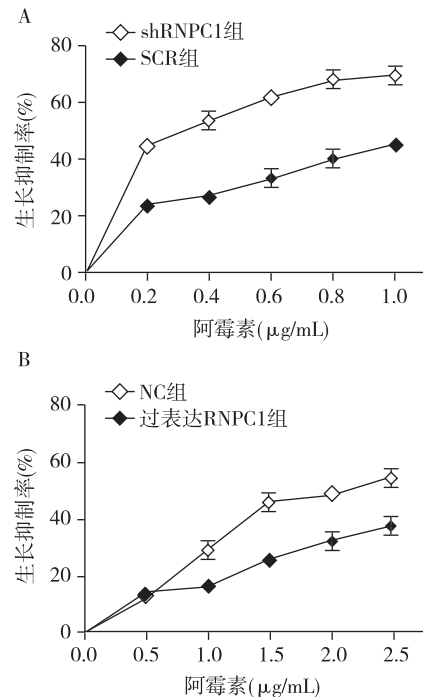


图 3 A: 敲除 RNPC1 组和敲除对照组的细胞抑制率曲线; B: 过表达 RNPC1 组和过表达对照组的细胞抑制率曲线。

图 3 阿霉素对各组 MCF-7 细胞的抑制作用

Figure 3 Inhibition effect on MCF-7 cells by doxorubicin

2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

流式结果显示, $1.0 \mu\text{g/mL}$ 阿霉素处理各组细胞 24 h 后, shRNPC1 组凋亡率 (12.74 ± 1.05)% 明显高于 SCR 组 (9.78 ± 0.15)% ($P < 0.05$); 过表达 RNPC1 组凋亡率 (7.13 ± 0.37)% 显著低于 NC 组 (9.18 ± 0.10)% ($P < 0.05, n = 3$, 图 4)。

2.4 Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白表达

Western blot 结果显示, $1.0 \mu\text{g/mL}$ 阿霉素处理各组 MCF-7 细胞 24 h 后, shRNPC1 组抑凋亡蛋白 BCL-XL 的表达低于 SCR 组, 同时促凋亡蛋白 BIM 和 BID 的表达明显高于 SCR 组(图 5); 过表达 RNPC1 组抑凋亡蛋白 BCL-XL 的表达高于 NC 组, 促凋亡蛋白 BIM 和 BID 的表达明显低于 NC 组 ($P < 0.05, n = 3$, 图 6)。

3 讨论

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤之一, 占全球女性恶性肿瘤的 1/4。我国乳腺癌发病

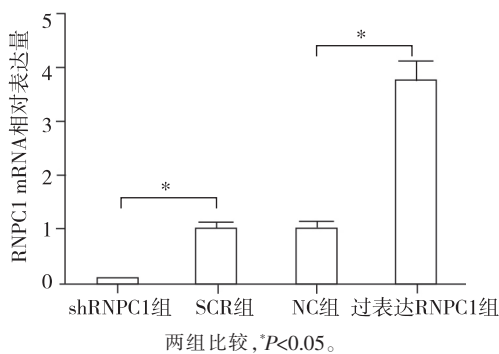


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 RNPC1 mRNA 的相对表达量

Figure 1 The mRNA expression of RNPC1 analyzed by qRT-PCR

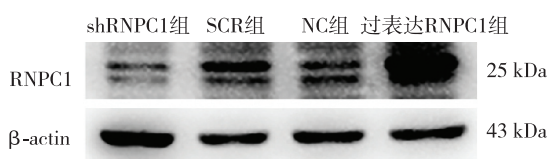


图 2 Western blot 检测各组 MCF-7 细胞中 RNPC1 蛋白表达量

Figure 2 The relative protein expression of RNPC1 in MCF-7 cells analyzed by Western blot

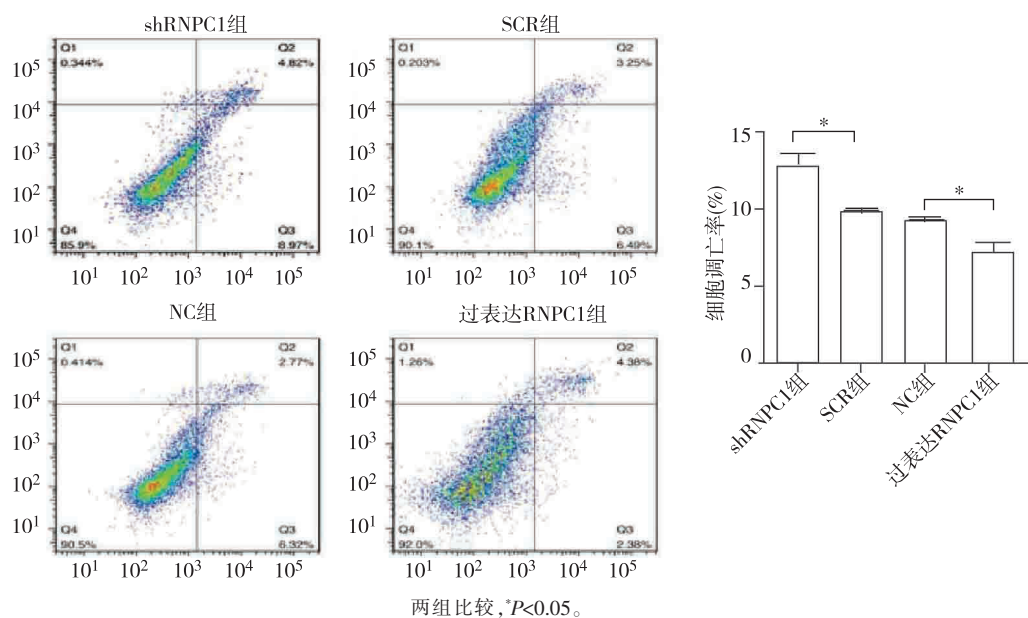


图 4 流式细胞术检测阿霉素对各组 MCF-7 细胞凋亡率的影响

Figure 4 Flow cytometry analysis was used to test the changes of drug sensitivity after the MCF-7 cells treated with doxorubicin

人数和死亡人数均位于女性恶性肿瘤的前列^[7-8]。目前化疗仍是治疗乳腺癌的主要方法，肿瘤化疗耐受是导致肿瘤综合治疗失败的主要问题。因此提高乳腺癌对化疗药物的敏感性是乳腺癌治疗的关键问题之一。蒽环类化疗药是临床常用的抗乳腺癌药物^[9]。阿霉素属于蒽环类抗肿瘤药，抗菌谱较广，主要通过直接嵌入 DNA 碱基对之间，干扰转录过程，阻止 mRNA 的形成，可以同时抑制 DNA 和 RNA，是当前乳腺癌化疗常用蒽环类药物。有研究表明，阿霉素耐药机制可能与多种基因的表达或者缺失有关，包括各种 miRNA 和通路相关基因^[10-11]，找出相关基因，有利于解决乳腺癌细胞化疗耐药进而提高临床疗效。

RNPC1 是一种 RNA 结合蛋白，主要参与 RNA 的剪接、多聚腺苷化作用、维持 RNA 的稳定和降解、RNA 转运等，对靶基因一般是转录后调控，可以结合靶基因的 mRNA 3'-非编码区的富含 AU 元件区 (AREs)^[12-13]。另外，RNPC1 还可以调节肿瘤细胞周期、影响肿瘤细胞的增殖和迁移侵袭能力^[14]。已有研究发现，RNPC1 是 p53 家族的靶点，可以调节 p53 家族其他成员 p63 和 p73 的稳定性，并且影响其功能^[15-16]。前期研究显示，RNPC1 可以通过影响 HER-2 的表达来影响乳腺癌靶向治疗药物曲妥珠单抗的敏感性^[5]，而 RNPC1 与蒽环类化疗药的敏感性研究报道较少。本研究考察 RNPC1 在乳腺癌中对阿霉素药

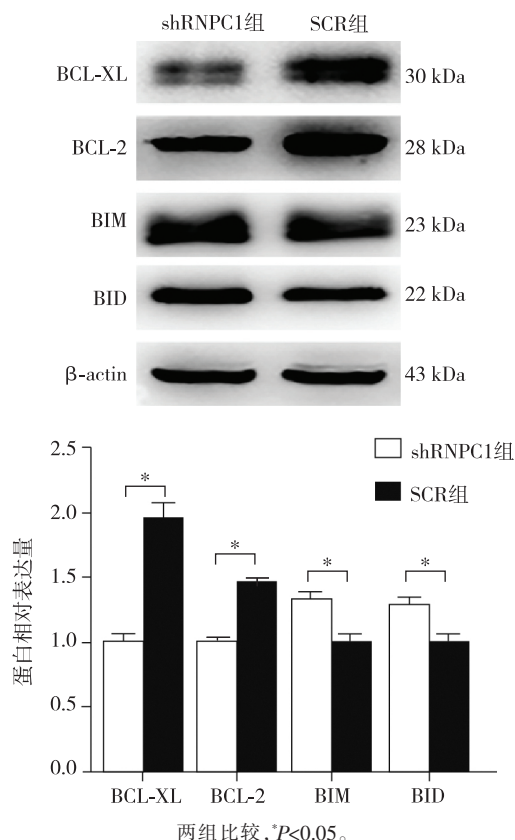


图 5 阿霉素处理敲除 RNPC1 组和敲除对照组 MCF-7 细胞后凋亡通路相关蛋白的表达

Figure 5 The relative expression of apoptosis pathway related proteins in the RNPC1 knocked down groups after treatment with doxorubicin

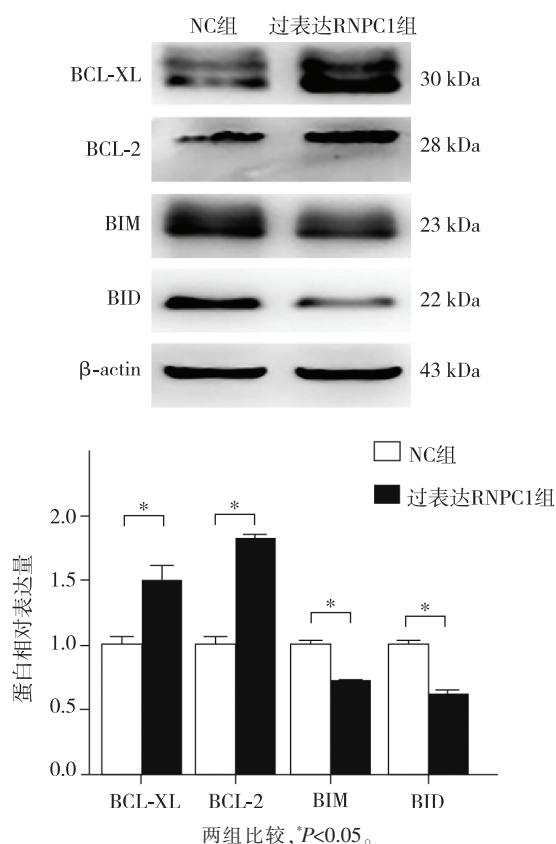


图 6 阿霉素处理过表达 RNPC1 组和过表达对照组 MCF-7 细胞后凋亡通路相关蛋白的表达

Figure 6 The relative expression of apoptosis pathway related proteins in the RNPC1 overexpressed groups after treatment with doxorubicin

效的影响。本研究通过慢病毒转染方法,发现 RNPC1 过表达后,可以通过调节凋亡相关蛋白表达,降低 MCF-7 细胞对阿霉素的敏感性;RNPC1 敲低后能明显增加 MCF-7 细胞对阿霉素的敏感性,与其调节凋亡相关蛋白有关。

综上所述,本研究证实了 RNPC1 在乳腺癌化疗耐受中发挥着重要作用,这可能为蒽环类药物的药物敏感性和耐药机制探索提供了新思路,并且 RNPC1 有望成为乳腺癌耐药治疗的新靶点。

[参考文献]

[1] Shu L, Yan W, Chen X. Rnpc1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(21):2961-2972
[2] 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

[3] Cho SJ, Jung YS, Zhang J, et al. The RNA-binding protein RNPC1 stabilizes the mRNA encoding the RNA-binding protein HuR and cooperates with HuR to suppress cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18):14535-14544
[4] Lou P, Li C, Shi L, et al. RNPC1 enhances progesterone receptor functions by regulating its mRNA stability in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10):16387-16400
[5] 李春莲, 周旭婕, 娄培培, 等. KNA 结合蛋白 38 通过增加人表皮生长因子受体 2 的表达诱导乳腺癌细胞 BT474 对曲妥珠单抗的敏感性[J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(3):172-178
[6] Lehnert M. Chemotherapy resistance in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(3C):2225-2226
[7] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in china, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132
[8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30
[9] Greene J, Hennessy B. The role of anthracyclines in the treatment of early breast cancer[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2015, 21(3):201-212
[10] Chen Y, Sun Y, Chen L, et al. MiRNA-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin through the suppression of E-cadherin-mediated PTEN/AKT signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5):1579-1584
[11] Gariboldi MB, Ravizza R, Molteni R, et al. Inhibition of stat3 increases doxorubicin sensitivity in a human metastatic breast cancer cell line [J]. *Cancer Lett*, 2007, 258(2):181-188
[12] Krecic AM, Swanson MS. HNRNP complexes: Composition, structure, and function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(3):363-371
[13] Ciafre SA, Galardi S. MicroRNAs and RNA-binding proteins: A complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer[J]. *RNA Biol*, 2013, 10(6):935-942
[14] 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
[15] Zhang J, Jun Cho S, Chen X. RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, regulates p63 expression through mRNA stability [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(21):9614-9619
[16] Yan W, Zhang J, Zhang Y, et al. P73 expression is regulated by RNPC1, a target of the p53 family, via mRNA stability[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(13):2336-2348

[收稿日期] 2017-03-11