

· 基础研究 ·

RNPC1 基因对人乳腺癌细胞 SUM1315 化疗药物敏感性的影响

薛金秋¹, 石 靓², 丁 强^{2*}¹南京医科大学第二附属医院乳腺外科, 江苏 南京 210011; ²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:探讨RNPC1对人乳腺癌细胞SUM1315化疗药物敏感性的影响及相关机制。方法:慢病毒转染技术将转染至SUM1315细胞中,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。采用实时荧光定量PCR和Western blot方法检测各组SUM1315细胞中RNPC1的mRNA和蛋白水平。用不同浓度的紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶化疗药物处理各组SUM1315细胞,通过CCK-8法测绘细胞存活曲线并计算半数抑制浓度(IC₅₀),紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶处理各组SUM1315细胞72 h,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:敲除RNPC1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($P < 0.05$)。紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶处理各组SUM1315细胞72 h后,shRNPC1组IC₅₀明显低于SCR组($P < 0.05$),过表达RNPC1组IC₅₀明显高于NC组($P < 0.05$)。用紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶处理各组SUM1315细胞72 h后,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($P < 0.05$)。结论:RNPC1基因能显著降低人乳腺癌细胞SUM1315对紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶化疗药物的敏感性,有望成为乳腺癌治疗的新策略。

[关键词] RNPC1基因;人乳腺癌细胞;化疗敏感性;慢病毒**[中图分类号]** R737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)05-648-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190504

Effects of RNPC1 gene chemosensitivity of human breast cancer cells SUM1315

Xue Jinqiu¹, Shi Liang², Ding Qiang^{2*}¹Department of Breast Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011;²Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of RNPC1 gene on chemosensitivity of human breast cancer cells SUM1315 and correlated mechanism. **Methods:** Lentivirus was used to over-express and knock-down RNPC1 in the SUM1315 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). Real-time PCR and Western blot were analyzed the mRNA and protein expression of RNPC1 in SUM1315 cells. The effect of RNPC1 gene on the sensitivity of the chemotherapeutics drug such as paclitaxel, Taxotere and 5-Fluorouracil with different concentration was detected by CCK8. Apoptosis of breast cancer cell after treated with paclitaxel, Taxotere and 5-Fluorouracil were analyzed by flow cytometry. **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 RNPC1 knock-down RNPC1 (shRNPC1) lentivirus. After treatment with different concentration of paclitaxel, Taxotere and 5-Fluorouracil, the IC₅₀ of shRNPC1 group was significantly lower than SCR group ($P < 0.05$). Furthermore, the IC₅₀ of RNPC1 group was significantly higher than NC group ($P < 0.05$). The flow cytometer assay was used after treatment with paclitaxel, Taxotere and 5-Fluorouracil for 72 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. **Conclusions:** RNPC1 gene can effectively decrease the sensitivity of human breast cancer cells SUM1315 to the chemotherapeutics drug such as paclitaxel, Taxotere and 5-fluorouracil, indicating that RNPC1 gene silencing might be considered as a new therapeutic strategy for breast cancer.

[Key words] RNPC1 gene; human breast cancer cells; chemotherapeutic sensitivity; lentivirus

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 648-652]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81572595; 81602336)

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

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤之一。乳腺癌的发生发展是一个多基因、多因素和多步骤的复杂过程,它们之间存在相互作用的调节关系。化疗是乳腺癌的主要治疗方法,但是耐药性的产生是化疗失败的主要原因,因此化疗的增敏作用也是目前的研究热点。RNPC1属于RNA结合蛋白家族成员^[1],是近年发现的一个新的与肿瘤相关的基因,在多种肿瘤组织中扩增,如乳腺癌^[2]、肾癌^[3]、结肠癌^[4]、食道癌^[5]、淋巴瘤^[6]等。研究证实RNPC1是p53家族的靶点,而且与p53形成负反馈调节作用^[7]。本研究通过敲除和过表达RNPC1,观察乳腺癌细胞SUM1315对化疗药物敏感性的变化,寻找乳腺癌化疗增敏作用的新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株SUM1315由美国密歇根大学的Stephen Ethier教授惠赠,干扰质粒短发夹RNA(shRNA)和过表达RNPC1由美国Origen公司设计,序列为5'-GGCACCACTTTCGTGCAGTACCAGGC-GCC-3',其表达载体pGFP-V-RS携带卡那霉素和嘌呤霉素抗性基因及绿色荧光蛋白基因。脂质体转染试剂Lipofectamine™ 2000、卡那霉素、嘌呤霉素(Invitrogen公司,美国),小鼠抗人GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物标记的羊抗兔IgG抗体、蛋白裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂PMSF、磷酸酶抑制剂(上海凯基公司),ECL显影液、RNase Free H₂O、0.25%胰酶(上海碧云天公司),RNA提取试剂盒、RNA扩增试剂盒(TaKaRa公司,日本),PVDF膜(Millipore公司,美国),DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素(Gibco公司,美国),引物由美国Invitrogen公司合成。紫杉醇(上海施贵宝制药有限公司),多西他赛(杭州赛诺菲制药有限公司),5-氟尿嘧啶(上海旭东海普药业有限公司)。CCK-8(Dojindo公司,日本)。Step One定量PCR仪(ABI Step OnePlus™,ABI公司,美国),Nanodrop分光光度计(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SUM1315细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养液中,置37℃,5%CO₂培养箱中,0.25%的胰酶消化传代。

1.2.2 细胞转染并筛选稳定表达细胞株

培养SUM1315细胞,生长至对数生长期,细胞融合70%~80%时,0.25%胰酶消化细胞,铺入6孔板

中,24 h待细胞充分贴壁,覆盖率达到70%左右时进行转染。转染过程严格按照说明书,具体步骤详见[1]。根据不同的实验目的在不同时间点进行相应处理。转染干扰RNPC1基因和空载体的细胞分别命名为shRNPC1和SCR。转染过表达RNPC1基因和空载体的细胞分别命名为RNPC1和NC。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测转染后RNPC1 mRNA的表达水平

细胞生长至对数期时,按照TRIzol试剂说明书提取细胞总RNA,再通过Prime Script RT Master Mix Perfect Real Time合成cDNA(37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃保存),PCR反应内参β-actin引物序列,正义:5'-GCTGTGCTATCCCTGTACGC-3';反义:5'-TGCCTCAGGGCAGCGGAACC-3'。RNPC1引物序列,正义:5'-ACGCCTCGCTCAGGAAGTA-3';反义:5'-GTCTTTGCAAGCCCTCTCAG-3'。使用SYBR Premix Ex Taq™试剂,反应体系20 μL,SYBR 2×10 μL,前后引物10 μmol各0.4 μL,cDNA 2 μL,灭菌蒸馏水7.2 μL。反应条件:预变性95℃ 30 s,变性95℃ 5 s,退火60℃ 30 s,共40个循环,Step One Plus™ Real Time PCR System。计算2^{-ΔΔCT}值为RNPC1基因的相对表达量。每个样本至少重复3次。

1.2.4 Western blot检测RNPC1蛋白表达的水平

收集对数生长期的细胞,按照RIPA裂解液说明书提取总蛋白,检测前测样品蛋白浓度。取等量待测蛋白样品及蛋白Marker上样,进行12%SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,加入抗RNPC1抗体,4℃孵育过夜,TBST清洗3次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG室温孵育2 h,TBST清洗3次后在ECL溶液中显色,同时GAPDH作为内参对照。每个样本至少重复3次。

1.2.5 CCK-8法检测不同浓度化疗药物处理后各组SUM1315细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)

取对数生长期的各组SUM1315细胞接种到96孔板,每组3个复孔,设置空白对照组。细胞过夜贴壁后,在shRNPC1组和SCR组分别加入2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 ng/mL的紫杉醇,RNPC1过表达组和NC组分别加入5、10、15、20、25 ng/mL的紫杉醇。在shRNPC1组、SCR组、NC组、过表达RNPC1组分别加入1、2、3、4、5 ng/mL的多西他赛和10、20、30、40、50 μg/mL 5-氟尿嘧啶。细胞处理72 h后撤去药物,每孔加入10%的CCK-8溶液,培养箱中继续孵育2 h,酶标仪450 nm波长测定吸光度值,计算各组细胞IC₅₀。

生长抑制率=[(对照孔的平均吸光度值-实验孔的平均吸光度值)/对照孔的平均吸光度值]×100%。

1.2.6 流式细胞学检测细胞凋亡率

取对数生长期的各组SUM1315细胞接种到6孔板,细胞贴壁后加入紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶作用72 h后收集细胞,按照试剂盒说明,胰酶消化收集细胞,PBS清洗后弃去上清,再用100 μL结合缓冲液重悬。每管加入4 μL AnnexinV-FITC,5 μL PI双染,避光孵育15 min后流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

采用SPSS23.0统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有实验结果重复3次。两组间比较采用*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 RNPC1基因干扰、过表达情况检测

实验中干扰、过表达慢病毒携带有绿色荧光蛋白基因,可以通过荧光倒置显微镜观察转染效率。经过嘌呤霉素抗性筛选稳定细胞,未转染细胞(SUM1315)则在1周内全部死亡。

实时荧光定量PCR结果显示,shRNPC1组和SCR组RNPC1 mRNA的相对表达量分别为 0.18 ± 0.03 和 0.99 ± 0.01 ($P < 0.05$);过表达RNPC1组和NC组RNPC1 mRNA的相对表达量分别为 4.31 ± 0.13 和 1.04 ± 0.11 ($P < 0.05$,图1)。shRNPC1组RNPC1蛋白表达量明显低于SCR组,同时过表达RNPC1组蛋白表达量明显高于NC组(图2)。

2.2 各组细胞体外药物敏感性分析

根据不同抗肿瘤药物对各组细胞生长抑制率,计算 IC_{50} 值(表1)。CCK-8检测结果显示,不同浓度紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶作用于各组细胞72 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、B、C);过表达RNPC1组的抑制率明显低于NC组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3D、E、F)。说明敲除RNPC1促进了乳腺癌细胞对紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶的敏感性;过表达RNPC1降低了乳腺癌细胞对紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶的敏感性。

2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

将各组SUM1315细胞铺入6孔板,待细胞贴壁后分别用10 ng/mL、3 ng/mL和20 μg/mL紫杉醇、多西他赛和5-氟尿嘧啶处理72 h后,shRNPC1组凋亡率明显高于SCR组,分别为32.2% vs. 17.7% ($P <$

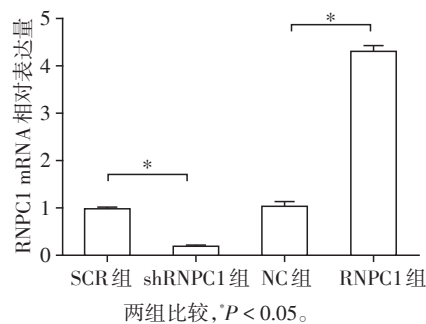


图1 qRT-PCR检测RNPC1 mRNA的相对表达量

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

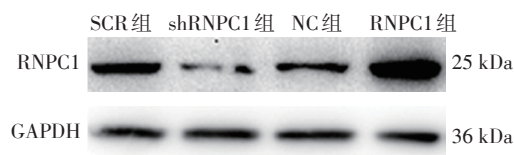


图2 Western blot检测各组SUM1315细胞中RNPC1蛋白表达量

Figure 2 The relative protein expression of RNPC1 in SUM1315 cells analyzed by Western blot

表1 不同化疗药物对各组SUM1315细胞的 IC_{50}

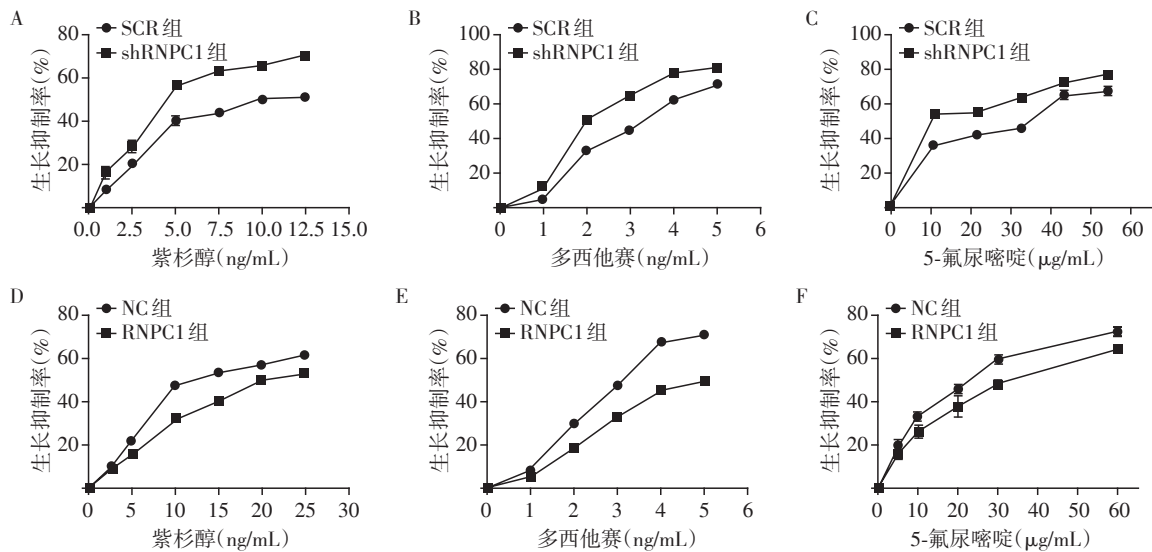
组别	$(\bar{x} \pm s)$		
	紫杉醇 (ng/mL)	多西他赛 (ng/mL)	5-氟尿嘧啶 (μg/mL)
NC组	11.45 ± 0.81	3.10 ± 0.35	22.53 ± 1.15
RNPC1组	23.49 ± 1.63	5.52 ± 0.41	36.31 ± 1.69
SCR组	9.83 ± 0.52	3.35 ± 0.07	32.97 ± 1.76
shRNPC1组	4.97 ± 0.33	2.02 ± 0.06	9.50 ± 0.48

0.05)、43.7% vs. 17.1% ($P < 0.05$)、26.9% vs. 13.3% ($P < 0.05$);过表达RNPC1组凋亡率显著低于NC组,分别为13.2% vs. 19.3% ($P < 0.05$)、9.4% vs. 14.4% ($P < 0.05$)、8.5% vs. 15.6% ($P < 0.05$,图4)。

3 讨论

RNPC1基因也称RBM38,编码2种亚基,分别为RNPC1a和RNPC1b。它们都能识别并结合靶基因,研究表明只有RNPC1a能发挥功能^[8]。RNPC1a调节不同的靶基因,其相应的机制和生物学功能也不同。例如,RNPC1a通过调节HER-2的表达进而影响细胞对曲妥珠单抗的药物敏感性^[9];而RNPC1a通过抑制E2F1转录因子调节细胞增殖^[10]。

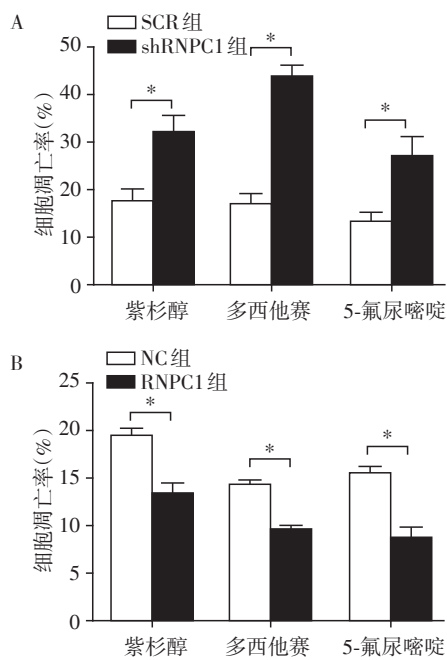
RNPC1是近年新发现的肿瘤相关基因,但是关于它的作用机制及发挥的功能尚未达成一致意见。本研究选取的SUM1315细胞恶性程度较高,属



A、B、C: 敲除 RNPC1 组和敲除对照组对不同药物的细胞抑制率曲线; D、E、F: 过表达 RNPC1 组和过表达对照组对不同药物的细胞抑制率曲线。

图3 紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶对各组 SUM1315 细胞的抑制作用

Figure 3 Inhibition effect on SUM1315 cells by paclitaxel, taxotere and 5-fluorouracil



A: 敲除 RNPC1 组和敲除对照组的细胞凋亡率; B: 过表达 RNPC1 组和过表达对照组的细胞凋亡率。两组比较, $P < 0.05$ 。

图4 流式细胞仪检测不同化疗药物对各组 SUM1315 细胞凋亡率的影响

Figure 4 Flow cytometry analysis was used to test the changes of drug sensitivity after the SUM1315 cells treated with different chemotherapeutics drug

达^[11]。p53 是一种抑癌基因,一半以上的肿瘤细胞存在 p53 基因突变^[12],这些 p53 基因突变可能参与某些肿瘤对化疗药物产生耐药性。近年研究显示突变型 p53 通过上调肿瘤多药耐药基因 1 (MDR-1),增加细胞对化疗的耐受,而野生型 p53 通过下调 MDR-1 增加细胞对化疗的敏感^[13];突变型 p53 还可以通过上调多药耐药相关蛋白 1 (MRP-1) 增加细胞对化疗的耐受^[14],而野生型 p53 对 MRP-1 启动子有转录抑制作用,从而增加细胞对化疗的敏感^[15]。p53 下游靶基因 p21 也可调节肿瘤细胞对化疗药物的耐受性。对于 5-氟尿嘧啶诱导的细胞凋亡, p21 不可抑制;而多柔比星诱导的细胞凋亡,无论是否为 p53 依赖性, p21 都可抑制^[16]。因此,缺失 p21 可能增加细胞对某些化疗药物的敏感性。本实验结果显示,用紫杉醇、多西他赛和 5-氟尿嘧啶处理各组 SUM1315 细胞 72 h 后,发现敲除 RNPC1 的 SUM1315 对紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶的敏感性有所增强。而过表达 RNPC1 的 SUM1315 对紫杉醇、多西他赛、5-氟尿嘧啶的敏感性有所减弱。同时,流式细胞仪分析也证实了 shRNPC1 组可显著增加细胞凋亡,而过表达 RNPC1 可显著减少细胞凋亡。但是 RNPC1 降低细胞对化疗的敏感性是否与 p53、p21 有关还有待于进一步研究。由于 RNPC1 通过稳定 p21 的表达抑制细胞增殖, RNPC1 又可以与多种不同的 mRNA 广泛结合,进而调节该靶基因的功能,因此可能会发挥多种生物学功能。

于突变型 p53 的乳腺癌细胞。有研究表明,与野生型 p53 相比,突变型 p53 乳腺癌组织中 RNPC1a 高表

本研究选取了多种临床常用的化疗药物,观察了敲除和过表达RNPC1对具体临床化疗药物敏感性的影响,使其可能成为乳腺癌新的治疗靶点,为进一步研究其功能及耐药性的产生机制奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] 染秀清,潘江,周文斌,等. shRNA干扰沉默RNPC1 α 基因对SUM1315细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学报),2013,33(7):861-866
- [2] 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
- [3] 黄雯,季春梅,杨海伟,等. RNA结合蛋白RNPC1对肾癌细胞生物学功能的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(4):365-370
- [4] Korn WM, Yasutake T, Collins C, et al. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization[J]. Genes Chromosomes & Cancer, 1999, 25(2):82-90
- [5] Hotte GJ, Linam-Lennon N, Reynolds JV, et al. Radiation sensitivity of esophageal adenocarcinoma: the contribution of the RNA-binding protein RNPC1 and p21-mediated cell cycle arrest to radioresistance [J]. Radiat Res, 2012, 177(3):272-279
- [6] Zhang J, Cho SJ, Zhang J, et al. Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas[J]. Genes Dev, 2011, 25(14):1528-1543
- [7] Cho S J, 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
- [8] Shu LM, Yan WS, Chen XB, et al. 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
- [9] 李春莲,周旭婕,娄培培,等. RNA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BT474细胞对曲妥珠单抗的敏感性[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(3):172-178
- [10] 吴靓,周旭婕,李小霞,等. RNPC1通过抑制Snail表达影响乳腺癌转移[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(8):938-942
- [11] Leveille N, Elkon R, Davalos V, et al. Selective inhibition of microRNA accessibility by RBM38 is required for p53 activity[J]. Nat Commun, 2011, 2:513
- [12] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ, et al. Surfing the p53 network[J]. Nature, 2000, 408:307-310
- [13] 周旭婕,吴靓,朱磊,等. RNPC1基因对乳腺癌细胞MCF-7阿霉素药物敏感性的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学报), 2017, 37(9):1099-1103
- [14] Tsangw P, Chaus P, Fung KP, et al. Modulation of multi-drug resistance-associated protein 1 (MRP1) by p53 mutant in Saos-2 cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 51(2):161-166
- [15] Wang Q, Beck WT. Transcriptional suppression of multi-drug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53[J]. Cancer Res, 1998, 58(24):5762-5769
- [16] Mahyar-Roemer M, Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents [J]. Oncogene, 2001, 20(26):3387-3398

[收稿日期] 2018-10-11