

ABCE1基因沉默对人乳腺癌细胞MCF-7 增殖、凋亡的影响

龚向南¹ 黄波^{1*} 周红丽²

(¹辽宁医学院附属第一医院胸外科, 锦州 121000; ²辽宁医学院附属第一医院肾内科, 锦州 121000)

摘要 为研究ABCE1基因沉默对人乳腺癌MCF-7细胞增殖、凋亡的影响并初步探讨其机制, 将构建好的ABCE1的siRNA绿色荧光载体转染入乳腺癌细胞MCF-7中, 于荧光显微镜下观测转染效率, 运用Western blot及RT-PCR实验证实基因沉默的效果, 同时应用Western blot检测RNase L蛋白的表达, MTT法分析细胞增殖能力并绘制细胞生长曲线, 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果显示, 将构建好的载体成功转入了乳腺癌细胞MCF-7。转染ABCE1-siRNA后细胞活性降低, ABCE1的表达受到阻断($P<0.01$), RNase L蛋白含量明显增加($P<0.01$), 细胞的增殖能力明显降低而凋亡率显著增加($P<0.01$)。证实: ABCE1-siRNA可成功沉默乳腺癌MCF-7细胞ABCE1基因的表达, 沉默该基因可抑制人乳腺癌细胞MCF-7增殖并诱导细胞凋亡, 其机制可能与其阻断了2-5A/RNase L细胞通路有关。

关键词 乳腺癌; MCF-7; 小干扰RNA; ABCE1; 核糖核酸酶L

Effects of ABCE1 Gene Silence in Proliferation and Apoptosis of Human Breast Cancer Cells MCF-7

Gong Xiangnan¹, Huang Bo^{1*}, Zhou Hongli²

(¹Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China;

²Department of Kidney, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract This paper aim at investigating the effects of ABCE1 gene silence in proliferation and apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 and discuss its mechanism preliminarily. The siRNA vector of constructed ABCE1 was transfected into MCF-7. The efficiency of transfection was observed under the fluorescence microscope. Effects of gene silencing was confirmed by Western blot and RT-PCR. Expressions of RNase L protein was examined by Western blot. The proliferation was analysed by MTT and growth curve was drew. The apoptosis was analysed by flow cytometry. Results showed that ABCE1-siRNA was transfected into MCF-7 successfully. After transfection, cell viability reduced and expression of ABCE1 were blocked ($P<0.01$). The expression of RNase L increased obviously ($P<0.01$). The ability of cell proliferation decreased but cell apoptosis rate increased ($P<0.01$). From discussion we can draw the conclusion that ABCE1-siRNA can successfully silence ABCE1 gene in human breast cancer cells MCF-7. Silencing this gene can restrain the proliferation of human breast cancer cells MCF-7 and induce apoptosis. The mechanism may be related to blocking-up cell pathway of 2-5A/RNase L.

Key words breast cancer; MCF-7; siRNA; ABCE1; RNase L

收稿日期: 2013-05-09 接受日期: 2013-06-17

辽宁省科技厅自然科学基金(批准号: 201202143)和辽宁医学院博士启动基金(批准号: Y2011B04)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0416-4197594, E-mail: huangbo762000@126.com

Received: May 9, 2013 Accepted: June 17, 2013

This work was supported by the Science and Technology Department of Liaoning Province Natural Science Fund (Grant No.201202143) and the Liaoning Medical University Start-up Fund (Grant No.Y2011B04)

*Corresponding author. Tel: +86-416-4197594, E-mail: huangbo762000@126.com

网络出版时间: 2013-08-21 10:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130821.1031.001.html>

乳腺癌是全球各国常见的恶性肿瘤之一,在女性恶性肿瘤中排名第一位。最新统计显示,乳腺癌的发病率逐年上升,发病年龄却逐渐年轻化。肿瘤的发生发展与基因调控密切相关。近些年研究表明,三磷酸腺苷结合盒转运子E1(ATP-binding cassette E1, *ABCE1*)与肿瘤的生物行为有关。*ABCE1*基因隶属ATP结合盒转运子基因亚家族,可编码一种相对分子量为68 kDa的蛋白(*ABCE1*蛋白)。此蛋白位于胞浆及核膜,也有文献称其为核糖核酸酶L(RNase L)抑制因子^[1-2]。RNase L能够干扰细胞翻译过程从而诱导细胞凋亡。*ABCE1*基因可通过抑制细胞内RNase L的活性来抑制细胞凋亡并引起细胞增殖^[3-4]。未见文献报道*ABCE1*基因的表达对乳腺癌是否存在相关的作用以及作用的机制。本研究采用小干扰RNA(siRNA)技术,将已构建成功的*ABCE1*的siRNA载体转染入乳腺MCF-7细胞株,达到沉默*ABCE1*基因的目的后,观察其对乳腺MCF-7细胞的增殖、凋亡的影响并就其分子机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

MCF-7细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。*ABCE1*的siRNA序列已构建成功,是根据*ABCE1*在GenBank中cDNA序列,使用BLAST软件设计的三对71个核苷酸两边含有酶切位点的核苷酸序列。序列如下:(siRNA-1)F: 5'-GAT CCG CTA CAG CGA GTA CGT TTA CCT GTG AAG CCA CAG ATG GGG TAA ACG TAC TCG CTG TAG CTT TTT TG-3'; (siRNA-1)R: 5'-AAT TCA AAA AAG CTA CAG CGA GTA CGT TTA CCC CAT CTG TGG CTT CAC AGG TAA ACG TAC TCG CTG TAG CG-3'; (siRNA-2)F: 5'-GAT CCG AGT ACG ATG ATC CTC CTG ACT GTG AAG CCA CAG ATG GGT CAG GAG GAT CAT CGT ACT CTT TTT TG-3'; (siRNA-2)R: 5'-AAT TCA AAA AAG AGT ACG ATG ATC CTC CTG ACC CAT CTG TGG CTT CAC AGT CAG GAG GAT CAT CGT ACT CG-3'; (siRNA-N)F: 5'-GAT CCG CGA GAC CTC AGT ATG TTA CCT GTG AAG CCA CAG ATG GGG TAA CAT ACT GAG GTC TCG CTT TTT TG-3'。经过严格的电泳测定并与pRNAT-U6.1/Neo载体(含绿色荧光)连接。分别为*ABCE1*-pRNAT-U6.1/Neo-siRNA-1、

ABCE1-pRNAT-U6.1/Neo-siRNA-2和*ABCE1*-pRNAT-U6.1/Neo-siRNA-N。以下简称为:*ABCE1*-siRNA-1、*ABCE1*-siRNA-2和*ABCE1*-siRNA-N(空质粒)。

主要试剂:胎牛血清、RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶均购于Hyclone公司,RT-PCR试剂盒购于大连宝生物公司,抗人*ABCE1*抗体、抗人RNase L抗体、羊抗兔抗体(二抗)购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养MCF-7细胞株。置于37 °C、5% CO₂的培养箱中,2~3 d换液1次,待贴壁细胞长满至瓶底约80%左右时传代。细胞进入对数生长期时开始实验。实验分组为四组,分别为A组(转染*ABCE1*-siRNA-1组)、B组(转染*ABCE1*-siRNA-2组)、C组(转染空质粒组)以及D组(空白对照组)。

1.2.2 转染 将MCF-7细胞铺于六孔培养板上,每孔约2×10⁵。培养细胞,待细胞长满至90%以上时更换为无血清的培养基,继续培养4 h后采用Lipofectamine 2000转染试剂进行转染,转染4 h后加血清继续培养。

1.2.3 荧光显微镜下观察 转染48 h后,PBS冲洗各组细胞2-3遍,于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot法测定*ABCE1*蛋白的表达以及RNase L的蛋白含量 收集转染48 h后的细胞,裂解并提取蛋白,BCA法定量,制备10%聚丙烯酰胺凝胶,电泳。PVDF膜转膜,封闭,洗膜液冲洗,分别浸入适当比例稀释的一抗中,于摇床上4 °C杂交过夜。取出PVDF膜,洗膜后放入装有二抗的离心管中,摇床上常温杂交1 h。TBST洗膜3遍。将ECL试剂盒内的两种试剂等体积混合,滴于PVDF膜上,反应1~2 min,上机检测。应用Quantity one软件分析结果。

1.2.5 RT-PCR检测*ABCE1* mRNA的表达 引物设计于生工生物工程(上海)有限公司:*ABCE1*_F: CCA GGT GAA GTT TTG GGA TTA G, *ABCE1*_R: AGG TTT GAT GAT GGC TTT TAG G,按照购买的RT-PCR试剂盒说明书进行实验,提取RNA,逆转录合成cDNA,PCR扩增,PCR反应。检测结果并应用Quantity one软件分析结果。

1.2.6 MTT法检测细胞增殖能力 将四组细胞消化下来,分别加入1640培养基配,吹打均匀制成单细胞悬液,细胞计数。按10%的比例加入胎牛血清吹

打均匀, 接种于96孔板中, 每孔约 4×10^3 细胞, 每孔体积为0.2 mL, 共铺4个板, 每板分4组(分别为A、B、C、D组), 每组9个孔, 培养细胞。选取培养24, 48, 72, 96 h四个观察点, 分别取出每个培养板并加入配置好的5 mg/mL的MTT 20 μ L, 继续培养4 h后, 弃上清, 每孔加入150 μ L DMSO, 震荡。待结晶物充分溶解后, 用酶标仪检测490 nm波长每孔的吸光度并绘制细胞生长曲线图。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率 转染四组细胞48 h后, 冷PBS冲洗2-3遍, 消化细胞并离心, 按照PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I试剂盒说明书进行实验: 用 $1 \times$ binding buffer重悬细胞, 浓度为 1×10^6 /mL。各组吸取100 μ L, 加5 μ L的PE Annexin V和5 μ L 7-AAD。常温避光漩涡孵化细胞15 min, 每组加入400 μ L的 $1 \times$ binding buffer。1 h内上机检测。

1.3 统计学处理

采用Origin 8与SPSS 15.0软件进行数据统计分析, 记录数据均用均数 \pm 标准差表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有显著性, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

2 结果

2.1 转染后荧光显微镜下可见绿色荧光

荧光显微镜下观察可见: A、B、C组细胞可见绿色荧光并呈增多趋势, 转染后48 h最多, 镜下荧光可占细胞总数70%以上。此后, A组和B组孔内大量细胞死亡, 荧光显微镜下可见绿色荧光的细胞明显变圆减少。C组细胞仍可见大量绿色荧光细胞, D(空白对照组)组始终未见绿色荧光。这证实我们将构建的带绿色荧光载体的目的基因成功地转染入细胞内(图1)。

2.2 Western blot法证实基因沉默的效果并验证其通路

转染48 h后, 如图2可见, 与空白对照组比较, 转染空载组的ABCE1蛋白含量未见改变($P > 0.05$), 提示ABCE1基因表达的效果与绿色荧光pRNAT-U6.1/Neo载体无关, 而是由所构建的ABCE1-siRNA所致。与转染空载组及空白对照组比较, 转染ABCE1-siRNA-1和转染ABCE1-siRNA-2的细胞ABCE1蛋白含量明显减少($P < 0.01$), 这提示我们已将目的基因转入细胞并达到了沉默ABCE1基因的效果。与转染

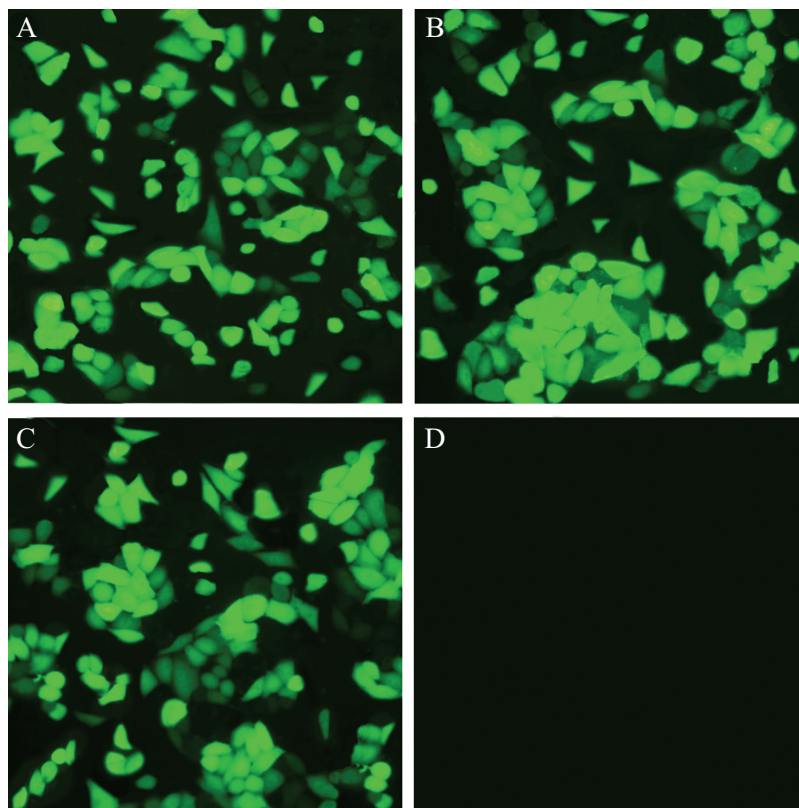


图1 转染后48 h MCF-7细胞绿色荧光蛋白的表达(200 \times)

Fig.1 Green fluorescent protein expression of MCF-7 cell 48 h after transfection (200 \times)

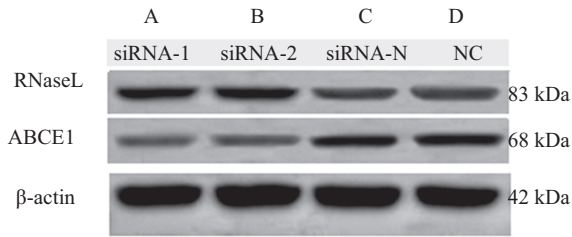


图2 Western blot法测定ABCE1的表达效率以及RNase L的蛋白含量

Fig.2 The expression of ABCE1 and the protein of RNase L examined by Western Blot method

表1 Western blot灰度值比值($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Western blot gray value ratio ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别 Groups	ABCE1(ABCE1/ β -actin)	RNase L(RNase L/ β -actin)
A	0.067 \pm 0.021*#	0.454 \pm 0.034*#
B	0.071 \pm 0.019*#	0.463 \pm 0.026*#
C	0.284 \pm 0.019	0.211 \pm 0.013
D	0.292 \pm 0.027	0.223 \pm 0.032

* $P < 0.01$, 与C组相比较; # $P < 0.01$, 与D组相比较。

* $P < 0.01$ vs group C; # $P < 0.01$ vs group D.

空载及空白对照组比较, 转染ABCE1-siRNA-1和转染ABCE1-siRNA-2的细胞RNase L的蛋白含量明显增加($P < 0.01$), 表明沉默ABCE1基因后, RNase L的蛋白含量明显增加。其结果的灰度值比值(ABCE1/ β -actin, RNase L/ β -actin)如表1。

2.3 RT-PCR证实基因沉默的效果

转染48 h后, 与D组比较, C组的ABCE1 mRNA含量未见改变($P > 0.05$), 再次排除了pRNAT-U6.1/

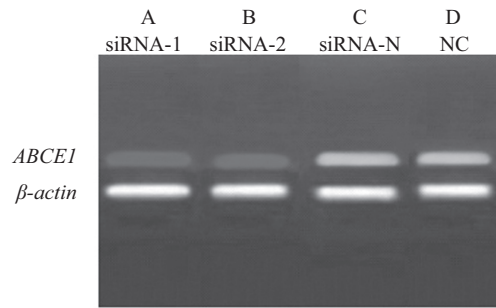


图3 RT-PCR检测ABCE1 mRNA的表达

Fig.3 The expression of ABCE1 mRNA examined by RT-PCR method

Neo载体的干扰。与C组和D组相比较, A组和B组ABCE1 mRNA含量明显减少(图3), 且具有统计学意义($P < 0.01$), 这使得沉默ABCE1基因的效果再次得到证实。结果灰度值的比值(ABCE1/ β -actin)分别是A组: 0.254 \pm 0.027, B组: 0.263 \pm 0.036, C组: 0.632 \pm 0.009, D组: 0.634 \pm 0.032($\bar{x}\pm s, n=5$)。

2.4 MCF-7细胞的生长增殖在ABCE1基因沉默后显著变缓

MTT法结果显示: 与空白对照组细胞相比较, 转染空质粒组的细胞增殖未见改变($P > 0.05$), 排除了绿色荧光pRNAT-U6.1/Neo载体的干扰细胞生长的可能性。而转染ABCE1-siRNA-1和转染ABCE1-siRNA-2的细胞增殖发生明显的减慢($P < 0.01$), 表明ABCE1基因的表达与MCF-7细胞的生长增殖具有一定的相关性。绘制其D值曲线图如图4。

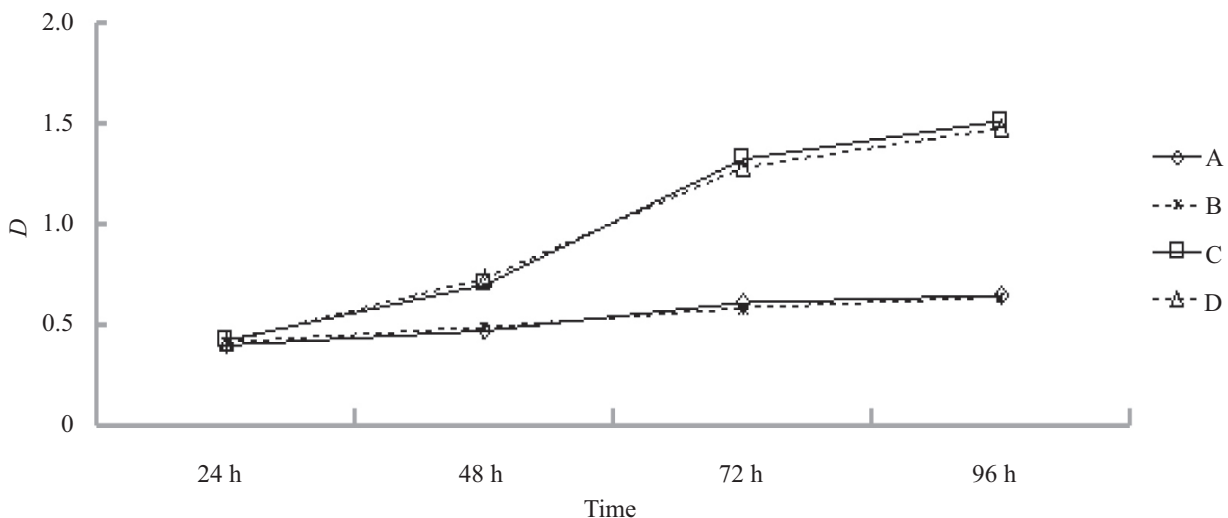


图4 各组MCF-7细胞生长曲线图

Fig.4 Growth curves of MCF-7 cells in each group

2.5 MCF-7细胞在*ABCE1*基因沉默后出现大量凋亡

流式细胞术检测可见(图5): 转染后48 h, 与空白对照组细胞相比较, 转染空质粒组的细胞凋亡改变不明显($P>0.05$), 排除了绿色荧光pRNAT-U6.1/Neo载体干扰的可能性。而转染*ABCE1*-siRNA-1和转染*ABCE1*-siRNA-2早期凋亡的细胞明显增多($P<0.01$), 表明*ABCE1*基因对MCF-7细胞的凋亡具有一定的抑制作用。其数据分析如表2。

表2 各组MCF-7细胞凋亡率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Apoptosis rate of MCF-7 cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别 Group	凋亡率(%) Apoptosis rate(%)
A	18.62±1.27**
B	19.01±1.81**
C	4.98±1.17
D	5.12±1.86

* $P<0.01$, 与C组相比较; ** $P<0.01$, 与D组相比较。

* $P<0.01$ vs group C; ** $P<0.01$ vs group D.

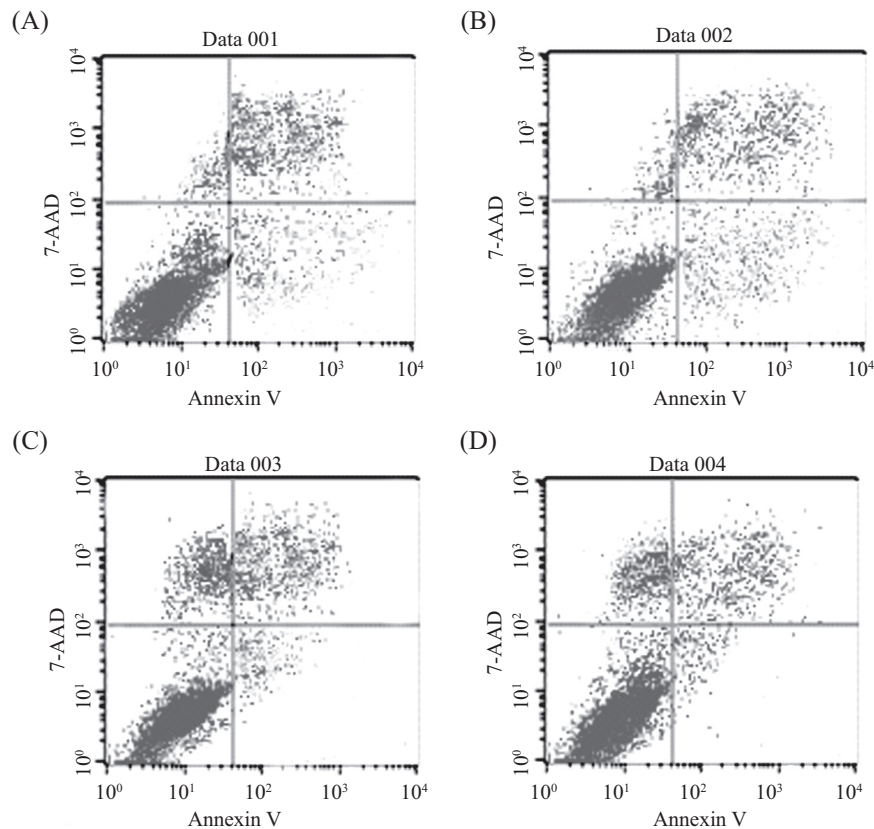


图5 流式细胞术检测各组细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis tested by flow cytometry

3 讨论

乳腺癌早期可有血运转移, 这使乳腺癌成为一全身性疾病。目前, 临床上对乳腺癌患者以手术治疗为主, 辅以化疗、内分泌、放疗以及生物治疗。但是手术造成的创伤和放、化疗带来的不良反应以及患者对放、化疗的耐受导致传统治疗具有局限性, 也是当前肿瘤治疗所面临的重大问题。因此, 需要探索并开发新的手段来完善治疗。随着人类基因组计划的完成及功能基因组学的发展, 基因治疗在肿瘤的治疗方面的应用得到重视^[5]。乳腺癌的发生和发展是多基因共同参与的极为复杂的过程, 目前已发

现部分与乳腺癌发生发展密切相关的基因^[6]。寻找新的差异表达基因, 并确定其在乳腺癌中的作用, 对于乳腺癌的诊断、治疗和预防均有非常重要的意义。

正常细胞内核糖核酸酶L(RNase L)会因2-5寡聚核苷酸(2-5A)含量的增加而被激活, 被激活后的RNase L会特异性降解RNA, 使细胞无法正常合成蛋白质从而引起凋亡, 此通路称为2-5A/RNase L通路^[7]。有研究表明, *ABCE1*蛋白可能通过抑制细胞内RNase L的活性, 阻断2-5A/RNase L通路, 细胞凋亡被抑制从而异常增殖, 故有文献称*ABCE1*基因为核糖核酸酶L抑制因子^[8]。多种肿瘤如结肠癌、直肠癌、前列腺癌

中, *ABCE1*基因均过度表达^[9]。沉默*ABCE1*基因后, 肿瘤细胞增殖凋亡发生明显改变。Huang等^[10]研究发现, 转染*ABCE1*基因的siRNA表达载体对人小细胞肺癌细胞的增殖、侵袭、迁移及凋亡均有一定的影响。使用*ABCE1*特异性shRNA的慢病毒载体感染人乳腺癌细胞后, 细胞生长受到显著的抑制, 凋亡率增加^[11-12]。上述均提示*ABCE1*基因与恶性肿瘤有着较为密切的关系, 但未有文献报道其是否对乳腺癌的发生发展有影响。

我们的研究表明, 转染*ABCE1*-siRNA-1和转染*ABCE1*-siRNA-2的MCF-7细胞在荧光显微镜下观察, 细胞内可见绿色荧光, Western blot法和RT-PCR检测*ABCE1*基因的表达受到阻断, 从而证实了其靶向沉默*ABCE1*的效果。转染48 h后, 转染*ABCE1*-siRNA-1和*ABCE1*-siRNA-2与转染空质粒组比较带荧光的细胞明显变圆减少, 考虑转染*ABCE1*-siRNA-1和*ABCE1*-siRNA-2后细胞发生了凋亡。转染siRNA靶向沉默*ABCE1*基因后MCF-7细胞的增殖能力受到了明显的抑制, 这一点由MTT法检测证实; 用Annexin V 7-AAD双染色法证实转染*ABCE1*-siRNA-1和*ABCE1*-siRNA-2的MCF-7细胞的大量死亡为凋亡, 且凋亡率呈显著增加。我们的研究结果与之前Huang等^[10]的研究结果相似, 证实了*ABCE1*基因在乳腺癌MCF-7细胞中的作用。Western blot法对四组RNase L的蛋白含量的检测结果即*ABCE1*基因受到干扰后, RNase L的含量显著增加, 提示*ABCE1*基因是可能通过抑制细胞内RNase L的活性, 从而阻断2-5A/RNase L通路, 干扰乳腺癌细胞的生物特性。本实验首次提出并验证了*ABCE1*基因是通过2-5A/RNase L通路影响乳腺癌MCF-7细胞的增殖和凋亡, 使*ABCE1*在肿瘤细胞中作用得到丰富。我们推测*ABCE1*在乳腺癌组织中也发挥着重要的作用, 今后我们将对*ABCE1*基因在乳腺癌组织中的作用进行研究, 以完善*ABCE1*基因对乳腺癌的

作用。

参考文献 (References)

- 1 Bartheleme D, Scheele U, Dinkelaker S, Janoschka A, Macmillan F, Albers SV, *et al.* Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J Biol Chem* 2007; 282(19): 14598-607.
- 2 Shichijo S, Ishihara Y, Azuma K, Komatsu N, Higashimoto N, Ito M, *et al.* ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncol Rep* 2005; 13(5): 907-13.
- 3 Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, *et al.* The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* 2010; 37(2): 196-210.
- 4 Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CU, Pestova TV, Pisarev AV. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J* 2011; 30(9): 1804-17.
- 5 Jangravi Z, Alikhani M, Arefnezhad B, Sharifi Tabar M, Taleahmad S, Karamzadeh R, *et al.* A fresh look at the male-specific region of the human Y chromosome. *J Proteome Res* 2013; 12(1): 6-22.
- 6 Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, Lövgren K, Jumppanen M, Staaf J, *et al.* Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat Genet* 2008; 40(1): 102-7.
- 7 Bisbal C, Salehzada T, Silhol M, Martinand C, Le Roy F, Lebleu B. The 2-5A/RNase L pathway and inhibition by RNase L inhibitor (RLI). *Methods Mol Biol* 2001; 160: 183-98.
- 8 Sims LM, Igarashi RY. Regulation of the ATPase activity of ABCE1 from *Pyrococcus abyssi* by Fe-S cluster status and Mg²⁺: Implication for ribosomal function. *Arch Biochem Biophys* 2012; 524(2): 114-22.
- 9 Tian Y, Han X, Tian DL. The biological regulation of ABCE1. *IUBMB Life* 2012; 64(10): 795-800.
- 10 Huang B, Gao Y, Tian D, Zheng M. A small interfering ABCE1-targeting RNA inhibits the proliferation and invasiveness of small cell lung cancer. *Int J Mol Med* 2010; 25(5): 687-93.
- 11 Liu DZ, Tian DL, Ren Y. Expression and clinical significance of ABCE1 in human lung adenocarcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2008; 30(4): 296-7.
- 12 Ren Y, Li Y, Tian D. Role of the ABCE1 gene in human lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2012; 27(4): 965-70.