

RNA 沉默 Pin1 表达对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

温媛媛 杨志强

摘要 **目的** 应用 RNA 干扰技术沉默 Pin1 表达后,观察其对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。**方法** 采用脂质体介导法将 Pin1 干扰片段 Pin1 siRNA 和对照片段 control siRNA 转染入乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 后,利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 Pin1 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达情况,并应用 MTT 法、Transwell 法和 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒及流式细胞仪技术分析检测 Pin1 对 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。**结果** Pin1 在乳腺癌细胞系中高表达。与未处理组及转染对照片段 control siRNA 组相比,沉默 Pin1 表达后,Pin1 mRNA ($P < 0.05$) 和蛋白 ($P < 0.05$) 表达均明显下降,细胞生长增殖能力 [$P > 0.05$ (第 1 天), $P < 0.01$ (第 2~4 天)] 减弱,细胞侵袭数目 (6.61 ± 0.53 , $P < 0.05$) 减少,细胞凋亡率 ($31.5\% \pm 3.06\%$, $P < 0.05$) 显著增加。**结论** 沉默 Pin1 表达后可抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭,促进乳腺癌细胞凋亡。

关键词 乳腺癌 Pin1 增殖 侵袭 凋亡

Down-regulation of Pin1 by RNA Interference on Cell Proliferation, Invasion and Apoptosis in Breast Cancer Cells. Wen Yuanyuan, Yang Zhiqiang. Zhoushan Hospital, Zhejiang 316000, China

Abstract Objective To investigate the effects of Pin1 reduction on cell proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells by silencing Pin1 gene using RNA interference technique. **Methods** MDA-MB-231 cells were transfected with Pin1 siRNA and control siRNA using Lipofectamine 2000. The expression of SIAH1 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot. The cell proliferation was analyzed by MTT and the cell invasion was tested by Transwell. Annexin V-FITC/PI reagent kit and Flow cytometry assay were used to analyze cell apoptosis. **Results** The expression of Pin1 was higher in breast cancer cells than in normal mammary epithelial cells. Compared with untreated and the cells transfected with control siRNA, the level of Pin1 mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.05$) were decreased in the cells transfected with the Pin1 siRNA. The cell growth rate [$P > 0.05$ (day 1), $P < 0.01$ (day 2-4)] was slower, the numbers of cell invasion (6.61 ± 0.53 , $P < 0.05$) were decreased, and the apoptotic rate ($31.5\% \pm 3.06\%$, $P < 0.05$) was increased in MDA-MB-231 cells transfected with Pin1 siRNA. **Conclusion** Knock down of Pin1 with Pin1 siRNA may suppress cell proliferation and invasion, promote cell apoptosis in breast cancer cells.

Key words Breast cancer; Pin1; Proliferation; Invasion; Apoptosis

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤。由于其早期发病时的临床症状隐匿,所以多数患者发现时已处于进展期,预后也较差,因此寻找有助于早期诊断的生物学指标对于乳腺癌诊断有着重要的意义。此外,这些指标也可以为我们治疗乳腺癌提供新的靶点。

Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase PPIase) 是多肽基脯氨酰顺反同分异构酶家族成员之一,人类 Pin 基因定位于 19p13,编码核蛋白 Pin1,分子质量 18kDa^[1]。已有研究表明 Pin1 在许多癌组织中过表

达,并参与多种肿瘤的发生发展过程,被称为肿瘤发生发展的催化分子,与肿瘤的增殖失控、血管形成、恶性侵袭有关^[2-5]。然而 Pin1 在乳腺癌发生发展中的具体机制至今还不是很清楚。本研究分析 Pin1 在乳腺癌细胞和乳腺正常上皮细胞系中的表达情况,并应用 RNA 干扰技术,观察沉默 Pin1 基因表达后对乳腺癌细胞增殖、侵袭能力和凋亡的影响,探讨 Pin1 在乳腺癌发生发展中的作用。

材料与方法

1. 细胞培养:乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 与 MCF-7,以及正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A。3 种细胞均为贴壁生长的细胞系。细胞接种在含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 环境下培养。

基金项目:国家自然科学基金(青年科学基金项目)资助项目(81201853);浙江省自然科学基金资助项目(Y2110620, Y2111209)

作者单位:316000 浙江省舟山市舟山医院

通讯作者:杨志强,主治医师,电子信箱:zqyang703@yahoo.com.cn

2. 主要试剂:DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司,兔抗人 Pin1 购于 Santa Cruz 公司,抗 β -actin 购于北京中杉金桥生物技术有限公司,甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)购自美国 Sigma 公司,Lipofect 2000 购于 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司,PCR 引物合成与测序委托大连 Takara 公司进行。

3. siRNA 干扰和细胞转染:Pin1 siRNA 购于 Santa Cruz 公司,实验分 3 组:未转染组,control siRNA 组和 Pin1 siRNA 组,每个实验均重复 3 次,转染具体步骤按 Lipofect 2000 试剂说明书进行。

4. Western blot:于 4℃ 下取 1~2g 标本,加约 5 倍湿重的裂解缓冲液,粉碎匀浆后,4℃ 静置 24h,低温高速离心(4℃,12000r/min,40min),提取上清即为总蛋白。经电泳、转印,5% 正常小牛血清封闭,抗 Pin1(1:200)和抗 β -actin(1:500)4℃ 下孵育,过夜;于二抗室温下孵育 2h。ECL 显色,X 线胶片曝光成像,经自动电泳凝胶成像分析仪采集图像。每组结果均为相同条件下重复 3 次。

5. RT-PCR:采用 Trizol™ 试剂提取细胞的总 RNA,利用 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒进行反转录。扩增 Pin1,以 β -actin 为内参。Pin1 上游引物:5'-TCAGGC-CGAGTGTACTAC-3',下游引物:5'-CGGAGGATGATGTG-GATG-3',扩增片段大小 427bp。 β -actin 上游引物:5'-CG-GCATTGTCAGCAACTG-3',下游引物:5'-CGCTCGGTCAG-GATCTTC-3',扩增片段大小 369bp。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,成像分析。

6. MTT 法检测细胞增殖:将未转染组,control siRNA 组和 Pin1 siRNA 组单个细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每孔含 10^4 个细胞,培养 24h,每孔加入 MTT 溶液继续培养 4h,加入 DMSO,490nm 波长下测定各孔吸收值,以不含细胞的等体积培养基作对照。绘制细胞生长曲线。

7. 细胞侵袭能力检测:实验分为 3 组,未转染组,control siRNA 组和 Pin1 siRNA 组。在 transwell 小室下室加入 600 μ l 含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,上室加入 100 μ l 预冷的用无血清 DMEM 培养基稀释的 Matrigel(1:7),将转染后 24h 的细胞接种到上室。37℃,5% CO₂ 孵箱中培养 32h 后吸尽培养基,PBS 清洗后,甲醇室温固定 15min,用棉签擦掉微孔膜上表面的细胞,苏木素染色,室温干燥过夜。取下微孔膜,置载玻片上,镜下观察。

8. Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测凋亡:收集未转染组,control siRNA 组和 Pin1 siRNA 组细胞,离心后用冷 PBS 洗 3 次,再次离心后用 Binding Buffer 重悬,调整细胞浓度至 1×10^6 细胞/毫升,取 100 μ l 细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ l,室温避光 15min 后加 400 μ l PBS,使用流式细胞仪进行检测。

9. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学分析软件,RT-PCR、Western blot、MTT、细胞侵袭和凋亡实验结果均采用 *t* 检验进行数据分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$

有统计学意义。

结 果

1. Pin1 在乳腺癌细胞系中高表达:RT-PCR 和 Western blot 结果显示,Pin1 mRNA 和蛋白在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 与 MCF-7 中表达高于乳腺正常上皮细胞系 MCF-10A($P < 0.05$,图 1)。

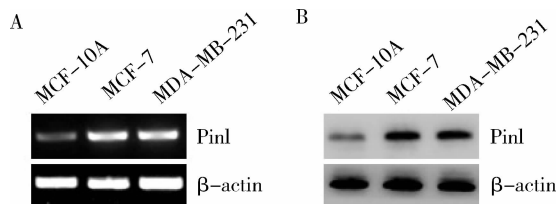


图 1 Pin1 在乳腺癌细胞系与乳腺正常上皮细胞系中的表达情况

A. Pin1 mRNA 在乳腺癌细胞系 MCF-7 与 MDA-MB-231 中表达高于乳腺正常上皮细胞系 MCF-10A;B. Pin1 蛋白在乳腺癌细胞系 MCF-7 与 MDA-MB-231 中表达高于乳腺正常上皮细胞系 MCF-10A

2. 沉默 Pin1 后 Pin1 mRNA 和蛋白表达:瞬时转染 48h 后,RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与未处理组及转染 control siRNA 组相比较,MDA-MB-231 细胞转染 Pin1 siRNA 后,Pin1 mRNA 和蛋白表达明显减少($P < 0.05$,图 2)。

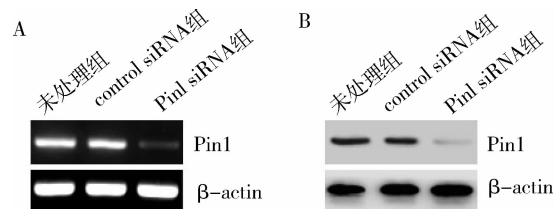


图 2 干扰 Pin1 后 Pin1 的表达情况

A. 与未处理组 and 对照组相比,干扰 Pin1 表达后,Pin1 mRNA 表达明显下降;B. 与未处理组 and 对照组相比,干扰 Pin1 表达后,Pin1 蛋白表达明显下降

3. 沉默 Pin1 表达可抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖:MTT 实验结果表明,与转染 control siRNA 或未处理细胞组相比,MDA-MB-231 细胞转染 Pin1 siRNA 后细胞的增殖能力明显减弱[$P > 0.05$ (第 1 天), $P < 0.01$ (第 2~4 天),图 3]。

4. 沉默 Pin1 表达可抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭:侵袭实验结果表明,乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转染 Pin1 siRNA(6.61 ± 0.53 , $P < 0.05$)后侵袭细胞数比转染 control siRNA(26.16 ± 2.12)或未处理细胞组(28.45 ± 2.36)明显减少(图 4)。

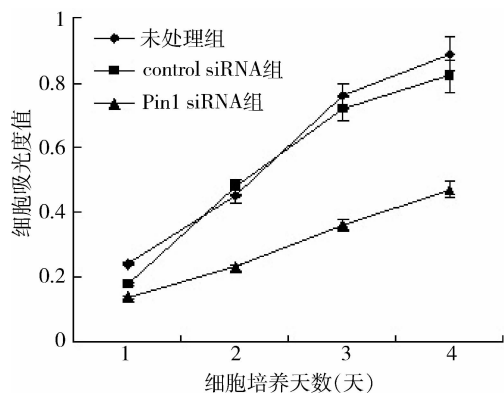


图3 干扰 Pin1 表达后乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞增殖能力明显减弱

5. 沉默 Pin1 表达可促进 MDA - MB - 231 细胞凋亡: 流式实验结果表明, 与转染 control siRNA 3.46% $\pm$ 0.31% 和未处理细胞组 3.68% $\pm$ 0.34% 相比, 转染 Pin1 siRNA 3.5% $\pm$ 3.06% ($P < 0.05$), 后 MDA - MB - 231 细胞凋亡率明显增加(图 5)。

讨 论

Pin1 在人类肿瘤发生发展中起重要作用, 最初研究发现 Pin1 主要是通过有丝分裂来调节细胞周期, 另有研究表明 Pin1 可调节 ki67, cyclinE 与 c - Myc 来调控 $G_{0/1}$ 到 S 期的进程^[6,7]。Pin1 在许多肿瘤中高表达, 降低 Pin1 表达可以抑制宫颈癌细胞的增殖和促进细胞凋亡, 且与 cyclinD1 表达呈正相

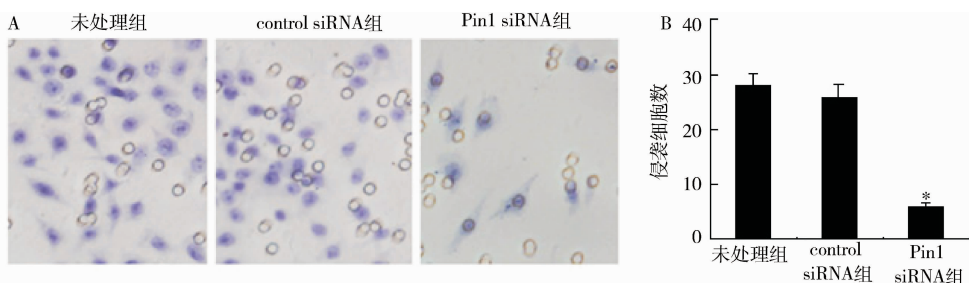


图4 干扰 Pin1 表达后 MDA - MB - 231 细胞侵袭能力明显减弱

A. 与未处理组和 control SiRNA 组相比, 乳腺癌细胞干扰 Pin1 表达后, 侵袭细胞数目明显减少; B. 各组别中细胞侵袭数目的统计学分析; 与其他两组相比, * $P < 0.05$

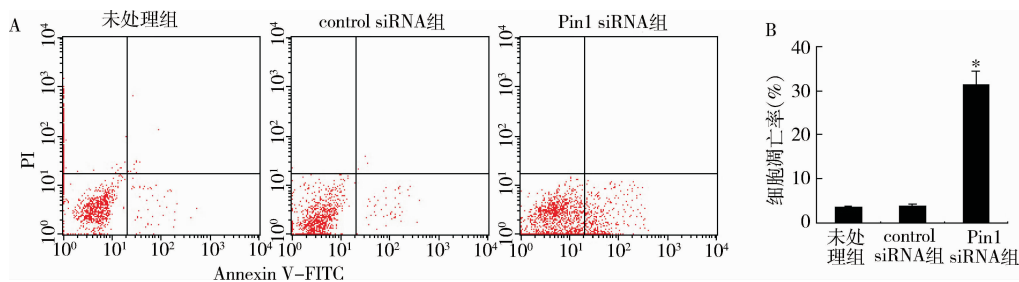


图5 干扰 Pin1 表达后 MDA - MB - 231 细胞凋亡率明显增加

A. 与未处理组和 control siRNA 组相比, 乳腺癌细胞干扰 Pin1 表达后, 细胞凋亡率明显增加; B. 各组别中细胞凋亡率的统计学分析图; 与其他两组相比, * $P < 0.05$

关^[8]。Pin1 在肝癌和食道癌中过表达, 且与肝癌和食道癌的发生相关^[4,9]。同样的结果在非小细胞肺癌中也得到了证实, Pin1 在非小细胞肺癌组织中过表达, 与淋巴结转移和肿瘤分级正相关, 且与患者预后负相关^[10,11]。Pin1 在口腔鳞癌中过表达, 但与临床分期及病理分级无相关性^[12]。最近有研究发现, 干扰 Pin1 表达可通过降低 p - AKT 和 p - JNK 磷酸化活性来抑制恶性黑色素瘤形成^[13]。Pin1 可促进 c - Myc 与启动子基因的结合来调控细胞增殖和侵袭^[14]。有研究报道, Pin1 在肿瘤发生中的作用机制

可能通过以下途径实现: ① Pin1 可通过 Ras/AP - 1 和 β - catenin/TCF 信号转导途径增强 cyclinD1 的转录^[2]; ② Pin1 可以与 p53 相互作用来增强突变型 p53 的稳定性, 从而促进肿瘤的发生^[15-17]。

已有研究报道 Pin1 在乳腺癌中过表达, 且其表达水平与乳腺癌的临床分期显著相关, 但 Pin1 对乳腺癌细胞的增殖、细胞凋亡及侵袭的影响未见报道^[2]。在本研究中, 我们观察发现, Pin1 在乳腺癌细胞系 MCF - 7 和 MDA - MB - 231 中 mRNA 和蛋白表达均明显高于乳腺正常上皮细胞系, 这与 Wulf 等^[2]

报道相一致。与未处理组和转染对照 siRNA 组相比,干扰 Pin1 表达后,乳腺癌细胞增殖能力显著降低。同时侵袭实验表明,乳腺癌细胞侵袭能力明显减弱。流式结果表明,干扰 Pin1 表达后可诱导乳腺癌细胞凋亡。Wulf 等^[2]发现,cyclinD1 作为 Pin1 的靶基因发挥重要作用,Pin1 不仅可促进 cyclinD1 转录,同时可通过 cyclinD1 从细胞核迁移入细胞质降解途径引起 cyclinD1 过表达来调控乳腺癌发生。Pin1 还可通过调控突变型 p53 的转录活性来增加乳腺癌细胞的侵袭能力^[18~20]。另有研究表明,RUNX3 是一种肿瘤抑制因子,干扰 Pin1 可抑制泛素化降解途径来上调 RUNX3 表达,从而影响乳腺癌的发生发展^[21]。Pin1 可通过多条信号途径及下游靶基因来调节乳腺癌细胞的生物学行为,还有待于我们进一步补充和完善。

综上所述,Pin1 可通过影响细胞生长增殖、侵袭和凋亡来调控乳腺癌的发生发展,干扰 Pin1 表达可抑制乳腺癌的恶性进程。Pin1 可作为乳腺癌治疗的一个重要靶基因。

参考文献

- Cambell HD, Webb GC, Fountain S, *et al.* The human PIN1 peptidyl – prolyl cis/trans isomerase gene maps to human chromosome 19p13 and the closely related PIN1L gene to 1p31 [J]. *Genomics*, 1997, 44(2):157 – 162
- Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, *et al.* Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c – Jun towards cyclin D1 [J]. *EMBO J*, 2001, 20(13):3459 – 3472
- Ryo A, Nakamura M, Wulf G, *et al.* Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta – catenin by inhibiting its interaction with APC [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(9):793 – 801
- Bao L, Kimzey A, Sauter G, *et al.* Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(5):1727 – 1737
- Ryo A, Liou YC, Lu KP, *et al.* Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 5):773 – 783
- Yeh E, Cunningham M, Arnold H, *et al.* A signalling pathway controlling c – Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(4):308 – 318
- Yeh ES, Lew BO, Means AR. The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouse embryo fibroblasts to genomic instability [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(1):241 – 251
- Li HY, Zhu T, Zhou JH, *et al.* Short hairpin RNA silences Pin1 and affects proliferation and apoptosis in HeLa cell line [J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2006, 41(6):417 – 421
- Jin H, Jiang J, Sun L, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is overexpressed in human esophageal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6):1191 – 1196
- He J, Zhou F, Shao K, *et al.* Overexpression of Pin1 in non – small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with lymph node metastases [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(1):51 – 58
- Tan X, Zhou F, Wan J, *et al.* Pin1 expression contributes to lung cancer: Prognosis and carcinogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(2):111 – 119
- Miyashita H, Mori S, Motegi K, *et al.* Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its levels correlate with cyclin D1 overexpression [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(2):455 – 461
- Jin J, Zhang Y, Li Y, *et al.* RNA – interference – mediated downregulation of Pin1 suppresses tumorigenicity of malignant melanoma A375 cells [J]. *Neoplasia*, 2013, 60(1):92 – 100
- Farrell AS, Pelz C, Wang X, *et al.* Pin1 Regulates the dynamics of c – Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(15):2930 – 2949
- Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults [J]. *Nature*, 2002, 419(6909):853 – 857
- Wulf GM, Liou YC, Ryo A, *et al.* Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50):47976 – 47979
- Zheng H, You H, Zhou XZ, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response [J]. *Nature*, 2002, 419(6909):849 – 853
- Girardini JE, Napoli M, Piazza S, *et al.* A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(1):79 – 91
- Marco N, Javier EG, *et al.* Wiring the oncogenic circuitry: Pin1 unleashes mutant p53 [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(9):654 – 656
- Hu H, Wulf GM. The amplifier effect: how Pin1 empowers mutant p53 [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(5):315
- Nicole TYH, Wu XW, Lim JS, *et al.* Prolyl isomerase Pin1 downregulates tumor suppressor RUNX3 in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(12):1488 – 1496

(收稿日期:2013 – 06 – 28)

(修回日期:2013 – 07 – 24)