

- 11 Hsu AR, Ghodadra NS, Provencher CM, *et al.* Biceps tenotomy versus tenodesis: a review of clinical outcomes and biomechanical results [J]. J Shoulder Elbow Surgery, 2011,20(2):326-332
- 12 Angelo DC, Antonio V, Edoardo Z, *et al.* Repairable rotator cuff tears with concomitant long-head biceps lesions: tenotomy or tenotomy/tenodesis? [J]. Knee Surgery Sports Traumatol Arthroscopy, 2012, 20(2):2553-2558
- 13 Jocelyn RW, Robin Q, Alicia A, *et al.* Isokinetic strength, endurance, and subjective outcomes after biceps tenotomy versus tenodesis[J]. The American Journal of Sports Medicine, 2011,39(4):857-865
- 14 Kim SH, Seung HS, Joo HO, *et al.* Biomechanical and histological analysis after tenotomy of the long head of the biceps in the rabbit shoulder model[J/OL]. J Orthopaedic Research March, 2012,30(9):416-422
- 15 Karataglis D, Papadopoulos P, Boutsiadis A, *et al.* Ultrasound evaluation of the distal migration of the long head of biceps tendon following tenotomy in patients undergoing arthroscopic repair of tears of the rotator cuff[J]. J Bone Joint Surg Br, 2012,94B(11):1534-1539
- 16 Drakos MC, Verma NN, Gulotta LV, *et al.* Arthroscopic transfer of the long head of the biceps tendon: functional outcome and clinical results[J]. Arthroscopy, 2008,24(2):217-223
- 17 Daniel SH, Alexander C, Anthony AR. Management of failed biceps tenodesis or tenotomy causation and treatment [J]. Sports Medicine and Arthroscopy Review, 2010,18(3):173-180
- 18 Jonathan FD, Kelly GK, Scott MT, *et al.* Subpectoral biceps tenodesis: an anatomic study and evaluation of At-risk structures[J]. The American Journal of Sports Medicine, 2012,40(10):2337-2341
- 19 Arne B, Frank M, Sebastian S, *et al.* Biomechanical Comparison of Intramedullary Cortical Button Fixation and Interference Screw Technique for Subpectoral Biceps Tenodesis [J]. Arthroscopy, 2013,29(5):845-853
- 20 Olimpio G, Giorgio G, Massimo DB, *et al.* Tenotomy versus Tenodesis in the treatment of the long head of biceps brachii tendon lesions [J/OL]. BMC Musculoskeletal Disorders 2012,13(10):205

(收稿日期:2013-06-23)

(修回日期:2013-07-15)

宫颈癌中黏蛋白表达的研究进展

丁丽娟 孔 祥

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,全球每年新发病例大约 50 万人,死亡病例 27.5 万例,占有新发恶性肿瘤的 15%,其中 80% 的宫颈癌病例发生在发展中国家。近年来,随着宫颈癌筛查的开展,发达国家宫颈癌的发生率及病死率明显下降。而在发展中国家,由于当地经济水平、健康模式和社会因素等,宫颈癌的发生率和病死率明显高于发达国家,且随着患病人数的增加,患病妇女有年轻化的趋势^[1,2]。

黏蛋白(mucin, MUC)是组成黏液的高糖基化高分子蛋白(> 250kDa),由 MUC 基因编码,主要产生于胃肠、呼吸和泌尿生殖等系统上皮细胞的细胞质及周围的细胞外环境。在正常情况下,黏蛋白对上皮组织有润滑和保护作用,帮助上皮细胞更新、分化和维持其完整性,同时参与细胞间信号转导,调节细胞间黏附,参与肿瘤的侵袭转移。一旦瘤变或癌变,黏蛋白表达的质和量将出现异常。随着肿瘤分子生物学的发展,已有研究证实在上皮细胞的恶性转变过程中大多伴有 MUC 异常糖基化,表明在肿瘤的发生、发展

及生物学特性中 MUC 具有重要作用^[3]。本文综述 MUC 基因表达与宫颈癌之间的关系。

一、MUC 基因概述

Gender 于 1988 年在乳腺癌细胞中发现 MUC1 并首次克隆成功第 1 个 MUC 基因。Gum 等于 1989 年首次克隆出首个分泌型基因 MUC2。至今已发现 23 种不同的 MUC(MUC1~20)。根据 MUC 的结构及功能分为分泌型和膜结合型 MUC 两大类。分泌型 MUC 包括可形成凝胶的 MUC,如 MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6(基因均位于 11p15.5)、MUC19(位于 12q12)和不可形成凝胶的 MUC 如 MUC7(位于 4q13.3)、MUC8(位于 12q24.3)、MUC9(位于 1p13)。膜结合型 MUC 包括 MUC1(位于 1q21)、MUC4、MUC20(均位于 3q29)、MUC13(位于 3q21.2)、MUC14(位于 4q24)、MUC3A、MUC3B、MUC10~12、MUC17(均位于 7q22)、MUC15(位于 11p14.3)、MUC16(位于 19p13.2)、MUC18(位于 11q23.3)、MUC21(位于 6p21.32)^[2]。黏蛋白的蛋白骨架富含大量短链 O-低聚糖链,其核心载有丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸残基,形成独特的可变串联重复序列。可形成凝胶的分泌型 MUC 单体之间主要通过二硫键形成

二聚体或多聚体,富含半胱氨酸结构域,参与低聚反应。分泌型 MUC 常在组织黏膜表面形成一层凝胶,形成疏水屏障,阻止大分子物质如蛋白水解酶和一些生化毒素等的渗透。另外,其低聚糖链能结合入侵的病原体,阻止病原体与黏膜表面接触,减弱免疫反应的活性。膜结合型 MUC 主要出现于上皮细胞的顶端表面,能传递细胞信号。部分膜结合型 MUC 也参与宫颈黏液层的形成,起到润滑、蛋白裂解等功能^[3]。

二、宫颈 MUC 基因表达

正常宫颈上皮覆盖着一层黏液,由颈管黏液分泌细胞分泌,保护上皮免受外界侵略,促进受精。黏液主要由高度糖基化的黏蛋白构成。目前与宫颈有关的 MUC 有 MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC8、MUC16 等。正常成年人宫颈上皮高表达 MUC1、MUC4、MUC5AC、MUC5B 和 MUC6,相对弱表达 MUC2。外宫颈和阴道鳞状上皮的基底细胞的细胞质低表达 MUC1,MUC4 主要表达在非角化鳞状上皮,在旁基底细胞的胞质内也有灶状 MUC4 高表达,在子宫内膜上皮主要表达 MUC1 和少量的 MUC6^[4]。人类子宫内膜上皮在月经周期受雌孕激素调节分化,子宫内膜分泌物量和质的变化与腺上皮的增殖相关,有研究发现,MUC1 在子宫内膜组织分泌期的早期到中期表达最高,在月经周期中的黄体期子宫颈内 MUC4 表达增加。因此,女性生殖组织的黏液分泌物和 MUC 基因表达依赖于月经周期。

三、MUC 与宫颈癌的诊断

宫颈癌是目前人类所有癌症中病因最明确的癌症。人乳头瘤病毒(HPV)感染是引起宫颈癌及癌前病变的主要因素,99.7%的宫颈癌患者都可检测到 HPV 的 DNA,HPV 几乎是所有宫颈鳞癌的致病因素,尤其是高危型 HPV(16,18 型等)更是宫颈疾病癌变的重要因素。WHO 于 1992 年宣布 HPV 是引起宫颈癌变的首要因素。但是宫颈鳞癌占宫颈癌的 80%~90%,剩下腺癌和腺鳞癌不能明确诊断。因此 HPV 单独应用于宫颈鳞、腺癌的早期诊断和筛查价值受限,所以有必要寻找新的标志物单独或联合 HPV 检测以提高宫颈癌患者的早期诊断率。

在研究 MUC 基因对于宫颈癌的诊断意义中,Munro 等^[4]发现 MUC4 可能是化生细胞腺体起源的一个种族标记,当 HPV 侵入宫颈细胞发生不典型增生的变化时,可能引起 MUC4 的持续表达,从而导致 MUC4 在恶性宫颈鳞状细胞癌和发育异常的宫颈病变(宫颈上皮内瘤变,CIN)表达上调。考虑到宫颈上

皮生长的动态性,MUC4 表达的改变也反映了化生的形态学变化。张继红等^[5]研究发现在宫颈鳞状上皮内没有 MUC1 的表达,而在鳞状细胞癌组织中不同程度的表达了 MUC1,该结果与 Tadashi^[6]的结果相同,提示 MUC1 是宫颈鳞状细胞癌发生、发展过程中重要的分子标志物。宫颈腺癌中出现较强和广泛的 MUC5AC 表达,有利于从宫颈起源的腺癌中区分子宫内膜腺癌和分化良好的宫颈腺癌,这种区别在宫颈活检病理检查时作用较大,但仍需要类似的实验来进一步确认^[7]。

宫颈病变有时很难区分良性和恶性,因为这些病变在形态学上有重叠。MUC 可能在鉴别宫颈良恶性病变中发挥作用。当上皮细胞经历恶性转化时黏蛋白基因异常表达,这可能会导致预期的黏蛋白减少和(或)产生结构不同和异常的黏蛋白。Baker 等^[8]研究显示 MUC1 在有炎症的宫颈鳞状上皮高表达,MUC4 在发育异常的(轻微至严重)宫颈鳞状上皮转变区高表达,MUC2 表达在不成熟的鳞状上皮化生。从宫颈良性到不典型增生的病变进展过程中可能与 MUC2 表达增加和 MUC5AC 表达的减少有关。Tera-da^[9]通过免疫组化的方法,研究多种因子在镜下早期浸润癌和 CINⅢ 的蛋白表达,结果发现 CINⅢ MUC1 表达阳性,而宫颈镜下早期浸润癌 MUC1 表达阴性。也有研究发现^[10],宫颈癌和 CIN 患者 CD44V6 和 MUC1 表达显著增加,且病变程度越高,表达异常越显著,CD44V6 和 MUC1 在宫颈癌的发展过程中发挥作用,有可能作为评估宫颈癌预后的生物学指标。研究宫颈原位腺癌(AIS)进一步提示了 MUC2 基因表达可能促进了癌的转化。AIS 与宫颈良性病变,尤其是宫颈管上皮化生的形态区别有时可能很难。AIS 和宫颈管上皮化生两者都显示核分裂象、不同程度的核异型性和有丝分裂的存在。纤毛细胞和夹层细胞的识别支持宫颈管上皮化生的诊断,但由于低存在率或炎症的影响很难确认。在 AIS 中 MUC4 和 MUC5AC 染色的相对缺乏可能有助于将 AIS 从正常的宫颈和良性的宫颈病变中区分出来,通过研究 MUC 鉴别出宫颈原位腺癌和宫颈良性病变有助于临床早期诊断和进一步处理,但由于有关 MUC 在宫颈癌和宫颈病变方面的研究较少,且研究结果不尽相同,故 MUC 和宫颈病变及宫颈癌的关系值得进一步深入研究。

四、MUC 与宫颈癌的预后与治疗

临床上宫颈癌的治疗通常采用手术和(或)放射、化学治疗,但对于患者术后或放化疗后的预后判

断仍存在问题,有研究发现 MUC 可能对于宫颈癌患者的预后判断有一定作用。MUC1 可作为某些上皮性肿瘤微转移的有效标志^[11]。MUC1 为 I 型跨膜蛋白,主要表达于乳腺、消化道、呼吸道和泌尿生殖道等上皮细胞的顶端,通常不被免疫系统识别。MUC1 释放活性分子参与信号转导及肿瘤的发生、发展及浸润、转移等,在恶性肿瘤组织中,MUC1 异常高表达,主要是由于其糖基转移酶活性增强而导致糖基化不完全或畸形糖基化,暴露出正常情况下隐蔽的表位被免疫系统识别,成为肿瘤特异性抗原。宫颈癌 I A ~ II A 期患者行根治术后,约有 35% 出现复发或转移,这与循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCS)及肿瘤的隐性微转移(occult micrometastases)有密切关系^[12]。Samouelian 等^[13]通过对 11 个生物标志物的研究,发现 MUC1 可作为宫颈癌淋巴结微转移的一种指标。另外,MUC1 和 CK20 可作为检测早期宫颈癌外周血微转移的生物学指标,为判断早期宫颈癌的复发转移、预后及防治提供了理论依据。在过去 10 年,由于细胞学筛查的进步,宫颈鳞癌的发生率明显降低,但宫颈腺癌发生率有所增加。Togami 等^[14]研究表明 MUC1 和(或)MUC16 可作为宫颈黏液腺癌的预后因子,MUC1 过度表达与生存率低和淋巴结转移有关。术前在宫颈活检标本中确定 MUC1 抗原的表达水平有助于决定是否行根治性子宫切除术和淋巴结清扫术。MUC16 是一种膜结合型黏蛋白,CA125 作为卵巢肿瘤细胞标志物,与 MUC1 相比,具有更大的糖基化胞外域,有助于形成非黏附性界线来阻止细胞黏附,所以对于宫颈癌而言联合检测 MUC 基因有助于较准确判断患者预后,提高治疗疗效^[15]。

对于不能接受手术及放疗的宫颈癌患者目前还缺乏有效的治疗方法,近年来肿瘤疫苗的研究备受关注。HPV 病毒疫苗已在临床应用于宫颈癌的预防和治疗并产生较好的疗效。目前宫颈癌疫苗主要针对高危型 HPV16 和 HPV18,在临床上可产生 70% 的反应率。但 HPV 疫苗有潜在的缺陷,对于靶目标通常只局限于一种抗原决定基,而已制造成功的 MUC1 疫苗,具有细胞表面蛋白多糖与多种类型肿瘤相关,包含多个抗原决定基的特点,因此,MUC 可能在宫颈癌的免疫治疗中提供新的途径,MUC 可作为疫苗和靶目标产生免疫反应治疗肿瘤。在多种恶性肿瘤中,MUC1 的过度表达及异常糖基化使其成为免疫治疗的靶点。有研究显示将 MUC1 疫苗用于乳腺癌和卵巢癌治疗,能提高疗效^[16]。在研究的两组乳腺癌和

卵巢癌患者,已经分别接受过 3 个以上疗程的化疗,出现严重不良反应或复发迹象,不能继续进行通常的化疗,转而采用含 MUC1 重组转基因疫苗治疗,结果发现肿瘤体积在部分患者明显缩小,肿瘤标志物水平呈下降趋势,中期生存时间均延长,故当患者化疗效果不佳时,采用疫苗治疗可能为患者提供新的治疗途径^[16]。由于宫颈癌中 MUC 过度表达,MUC 疫苗用于宫颈恶性肿瘤的治疗可能具有广泛的前景。

另外,肿瘤的基因治疗也是目前临床研究热点。MUC4 是一种膜结合型黏蛋白,在包括胰腺癌、卵巢癌和乳腺癌等恶性肿瘤中表达上调。MUC4 的表达与肿瘤的转移密切相关,过度表达可以破坏细胞的黏附能力,引起肿瘤细胞从原组织脱离,而 MUC4 对肿瘤细胞转移的影响在某种程度上具有更高的研究价值^[17~19]。此外,ErbB2(也称为 Her-2 / neu)受体在胰腺肿瘤细胞中受 MUC4 调控,激活这种受体可以刺激细胞增殖和细胞间黏附的信号分子增加,促进转移。ErbB2 在不同类型的宫颈癌中的不同表达与预后相关。MUC4 有 3 个类内皮生长因子结构域能作为 ErbB2 受体的配体,可以通过 ErbB2 受体调节 MUC4。有研究已经提出了 ErbB2 在宫颈癌症中存在基因扩增,MUC4 的异常表达可能会导致恶性肿瘤转移。进一步的探索 MUC4 和 ErbB2 在宫颈癌中的表达有助于靶向治疗途径,特别是对晚期和复发疾病的患者可能提供帮助。

宫颈 MUC 基因表达与宫颈疾病发生机制尚未完全明了,对于宫颈鳞癌以外其他类型的宫颈癌的早期诊断及晚期宫颈癌预后的判断和治疗,MUC 显示出一定的价值,近期研究发现 MUC 基因的异常表达与肿瘤的发生、发展和预后不良有关,MUC 可作为潜在的诊断标志物和治疗靶点包括免疫治疗和基因治疗,进一步的研究 MUC 基因将有助于宫颈疾病及宫颈癌的诊断治疗及预后判断。

参考文献

- 1 Soonthornthum T, Arias - Pulido H, Joste M, *et al*. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer [J]. *Ann Onc*, 2011, 22: 2166 - 2178
- 2 王辉,曹冬焱. 宫颈癌早期诊断研究进展[J]. *武警医学*, 2012, 23 (7): 632 - 634
- 3 Kim D, Junq WH, Koo JS. Expression of MUC1, MUC2, MUC5A and MUC5B in mucinous lesions of the breast [J]. *Pathobiology*, 2012, 79(3): 144 - 153
- 4 Munro EG, Maneesh J. Upregulation of MUC4 in cervical squamous cell carcinoma: pathologic significance [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2009, 28(2): 127 - 133

(下转第 13 页)

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)。

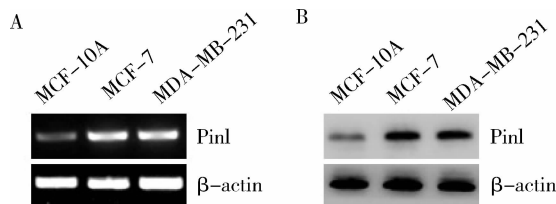


图 1 Pin1 在乳腺癌细胞系与乳腺正常上皮细胞系中的表达情况

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)。

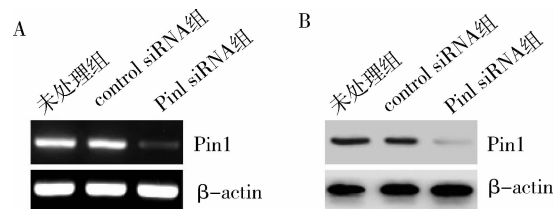


图 2 干扰 Pin1 后 Pin1 的表达情况

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)。

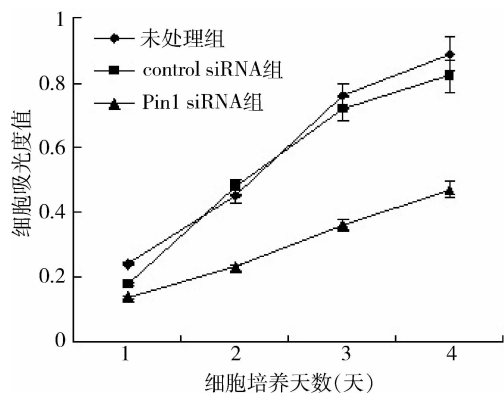


图3 干扰 Pin1 表达后乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞增殖能力明显减弱

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

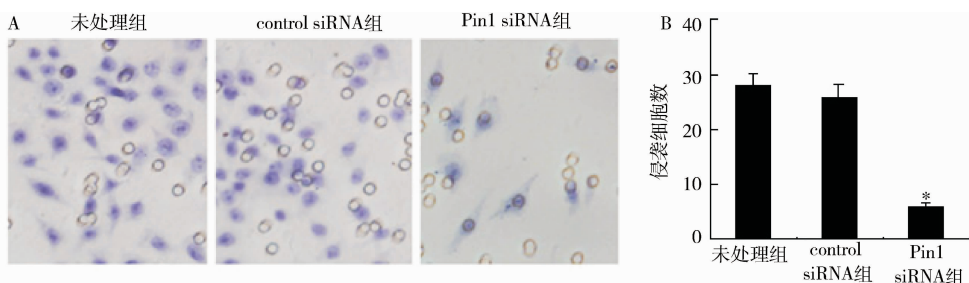


图4 干扰 Pin1 表达后 MDA - MB - 231 细胞侵袭能力明显减弱

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, * $P < 0.05$

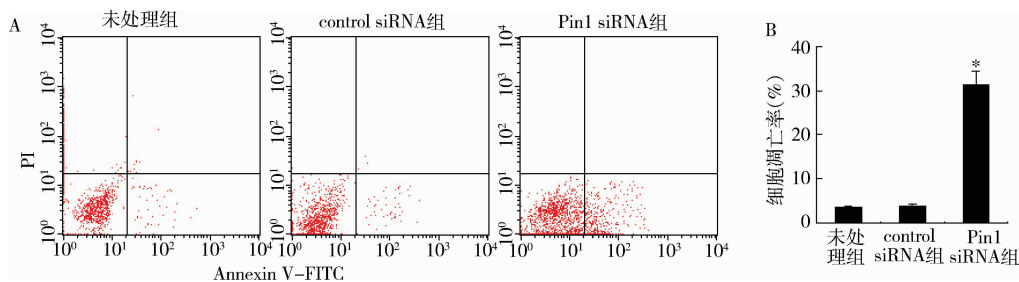


图5 干扰 Pin1 表达后 MDA - MB - 231 细胞凋亡率明显增加

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)