

• 论 著 •

RNA 结合蛋白 NONO 通过影响 SKP2、E2F8 表达 调控乳腺癌细胞增殖的研究

陈景森,熊志毅,李欢,张文夏,王思礼[△]

南方医科大学附属深圳妇幼保健院乳腺科,广东深圳 518017

摘要:目的 探讨不含 POU 结构域的八聚体核苷酸结合蛋白(NONO)是否通过影响 S 期激酶相关蛋白 2(SK P2)和 E2F 转录因子 8(E2F8)表达从而调控乳腺癌细胞增殖。方法 收集 2019 年 6 月至 2020 年 6 月于该院接受乳腺癌根治术治疗的 43 例乳腺癌患者的乳腺癌组织及癌旁组织石蜡块。采用免疫组织化学 SP 染色检测 NONO、SKP2 和 E2F8 在组织中的表达。将 MCF-7 细胞分为 MCF-7 组(无特殊处理)、sh-NC-MCF-7 组(加入 sh-NC 序列正义链的慢病毒 LV3 液)和 sh-NONO-MCF-7 组(加入含 sh-NONO 序列正义链的慢病毒 LV3 液)。检测 sh-NONO 的沉默效率,筛选稳定株。分析沉默 NONO 对乳腺癌细胞增殖能力、细胞周期以及 SKP2 和 E2F8 表达的影响。结果 乳腺癌组织中 NONO、SKP2 和 E2F8 阳性表达率显著高于癌旁组织($P < 0.05$);与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组 NONO 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),提示成功构建 NONO 沉默 MCF-7 细胞株;与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组增殖能力降低($P < 0.05$);与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组 G₀/G₁ 期细胞比例显著增加,S 期和 G₂/M 期细胞比例显著降低($P < 0.05$);与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组 SKP2 和 E2F8 蛋白表达水平以及 SKP2 和 E2F8 mRNA 相对表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 沉默 NONO 表达可通过下调 SKP2 和 E2F8 表达,诱导细胞周期阻滞,从而抑制乳腺癌细胞增殖。

关键词:乳腺癌; 不含 POU 结构域的八聚体核苷酸结合蛋白; S 期激酶相关蛋白 2; E2F 转录因子 8; 细胞增殖; 细胞周期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.07.012

中图法分类号:R446.8

文章编号:1673-4130(2022)07-0823-04

文献标志码:A

RNA-binding protein NONO regulates breast cancer cell proliferation by affecting the expression of SKP2 and E2F8

CHEN Jingsen, XIONG Zhiyi, LI Huan, ZHANG Wenxia, WANG Enli[△]Department of Breast, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital Affiliated to
Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518017, China

Abstract: Objective To investigate whether the non-POU domain containing octamer-binding protein (NONO) regulates breast cancer cell proliferation by affecting the expression of S-phase kinase-related protein 2(SK P2) and E2F transcription factor 8(E2F8). **Methods** The paraffin blocks of breast cancer tissue and paracancerous tissue of 43 breast cancer patients who received radical mastectomy in the hospital from June 2019 to June 2020 were collected. The expressions of NONO, SKP2 and E2F8 in tissues were detected by immunohistochemical SP staining. MCF-7 cells were divided into MCF-7 cell group (no special treatment), sh-NC-MCF-7 cell group (treated with lentivirus LV3 carrying the sense chain of sh-NC sequence) and sh-NONO-MCF-7 cells group (treated with lentivirus LV3 carrying the sense sequence of sh-NONO). The silencing efficiency of sh-NONO was detected, and stable strains were screened. The effects of silencing NONO on proliferation, cell cycle and expression of SKP2 and E2F8 in breast cancer cells were analyzed. **Results** The positive expression rates of NONO, SKP2 and E2F8 in breast cancer tissues were significantly higher than those in adjacent normal tissues ($P < 0.05$). Compared with MCF-7 and sh-NC-MCF-7 group, the expression of NONO protein in sh-NONO-MCF-7 group was significantly reduced ($P < 0.05$), indicating a success in constructing NONO-silencing MCF-7 cell line. Compared with MCF-7 and sh-NC-MCF-7 group, the proliferation ability significantly decreased in sh-NONO-MCF-7 group ($P < 0.05$), meanwhile the sh-NONO-MCF-7 group had a significantly higher proportion of cells arrested at G₀/G₁ phase, and a significantly lower proportion of cells ar-

作者简介:陈景森,男,主治医师,主要从事乳腺癌的早期预防及治疗研究。 [△] 通信作者, E-mail: xiefeidw@163.com。

本文引用格式:陈景森,熊志毅,李欢,等. RNA 结合蛋白 NONO 通过影响 SKP2、E2F8 表达调控乳腺癌细胞增殖的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(7): 823-826.

rested at S and G₂/M phases than those of MCF-7 and sh-NC-MCF-7 group ($P < 0.05$). Both protein and mRNA expression levels of SKP2 and E2F8 were significantly lower in MCF-7 and sh-NC-MCF-7 group than in sh-NONO-MCF-7 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing NONO expression can induce cell cycle arrest by down-regulating the expression of SKP2 and E2F8, thereby inhibiting breast cancer cell proliferation.

Key words: breast cancer; non-POU domain containing octamer-binding protein; S-phase kinase associated protein 2; E2F transcription factor 8; cell proliferation; cell cycle

乳腺癌是威胁女性健康的主要恶性肿瘤,且大多为激素敏感型。RNA 结合蛋白(RBP)为重要基因调控蛋白。研究发现,RBP 在乳腺癌细胞增殖等生物学活动中发挥重要作用^[1]。不含 POU 结构域的八聚体核苷酸结合蛋白(NONO)为近年新发现的多功能 RBP^[2]。但 NONO 在乳腺癌中的确切作用尚未完全明确。S 期激酶相关蛋白 2(SK2)和 E2F 转录因子 8(E2F8)为与细胞增殖相关的基因^[3-4]。其中 SK2 还可通过泛素-蛋白酶体途径,参与调控细胞周期^[5]。本研究旨在探讨三者乳腺癌中的表达,以及沉默 NONO 是否可通过影响 SK2 和 E2F8 的表达调控乳腺癌细胞增殖和细胞周期。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 6 月至 2020 年 6 月于本院接受根治术治疗乳腺癌患者的乳腺癌组织及癌旁组织石蜡块各 43 例。纳入标准:(1)手术病理证实为浸润性非特殊乳腺癌^[6];(2)性别为女性;(3)年龄 18~80 岁;(4)组织学分级为 I~III 级。排除标准:(1)术前接受过放、化疗等其他抗肿瘤治疗;(2)合并严重肝肾功能不全,或存在其他系统恶性肿瘤等。

1.2 试剂与仪器 DMEM 培养基、F12 培养基均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;PBS 缓冲液、胰蛋白酶、RIPA 液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、TBST 溶液、EDTA 溶液、DAB 显色试剂盒、苏木素、总 RNA 提取试剂盒、通用反转录试剂盒、CCK-8 试剂盒均购自北京索莱宝生物技术有限公司;兔抗人 NONO/p54nrb 抗体、兔抗人 SK2 抗体、兔抗人 E2F8 抗体、兔抗人 β -actin 抗体、HRP 标记二抗均购自美国 Sigma 公司;荧光定量试剂盒购自美国赛默飞世尔公司;碘化丙啶染色试剂盒(货号 KGA214)购自上海元象医疗器械有限公司。实时定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国赛默飞世尔公司,QuantStudio3 型)、酶标仪(美国赛默飞世尔公司,Multiskan FC 型)、流式细胞分析仪(美国赛默飞世尔公司,Invitrogen Attune NxT 型)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 SP 染色 取石蜡切片,依次进行脱蜡、水化处理,滴加 EDTA 溶液进行抗原修复,血清封闭,加入一抗 4℃ 过夜,加入二抗室温孵育 2 h,DAB 显色,滴加苏木素复染,依次进行脱水、透明处理,中性树脂封片,全自动免疫组化染色仪分析染色结果。NONO、SK2 和 E2F8 蛋白阳性信号为棕黄色或棕褐色颗粒,主要定位于细胞核;根据阳性细胞百分比

和染色强度乘积进行半定量分析,在显微镜下每张切片选择 5 个视野(400 倍),每个视野纳入 100 个细胞,计算平均阳性率和染色强度。阳性率:0~5%计 0 分;>5%~25%计 1 分;>25%~50%计 2 分;>50%~100%计 3 分。染色强度:未着色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。然后将阳性率积分与染色强度积分乘积的分值作为蛋白表达积分,蛋白表达积分 ≥ 3 分为阳性。

1.3.2 细胞培养 选用 MCF-7 细胞(购自北京中科质检生物技术有限公司)置于含 10%胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基中培养 2~3 d,培养条件为 37℃、5% CO₂。随后吸出原培养瓶中培养基,PBS 缓冲液润洗细胞 2 次,滴加 0.25%胰蛋白酶消化细胞,显微镜下观察消化情况,待贴壁松动、细胞变圆后加入完全培养基终止反应,将细胞悬液转移至新培养瓶内,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。

1.3.3 细胞转染 sh-NONO 序列正义链 5'-GGCGAAGUCUUCAUCAUAGG-3', sh-NC 序列正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUUC-3',由上海吉凯基因技术公司合成。取对数生长期细胞,分为 MCF-7 组(无特殊处理)、sh-NC-MCF-7 组(加入携带 sh-NC 序列正义链的慢病毒 LV3 液)和 sh-NONO-MCF-7 组(加入携带 sh-NONO 序列正义链的慢病毒 LV3 液),培养 24 h 后弃去旧培养液,加入含嘌呤霉素和 10%胎牛血清的 DMEM 培养基与 F12 培养基混合液(1:1)后继续培养。

1.3.4 Western blot 检测 取对数生长期细胞,接种于 6 孔板内,待融合度达 80%时,RIPA 液裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法定量分析;配置聚丙烯酰胺凝胶电泳液,电泳结束后将样品转移至 PVDF 膜,滴加含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h,PBS 缓冲液冲洗(3×5 min),分别滴加 1:1 000 稀释的兔抗人 NONO/p54nrb 抗体、兔抗人 SK2 抗体、兔抗人 E2F8 抗体,以兔抗人 β -actin 抗体为内参,4℃ 孵育过夜;PBS 缓冲液冲洗(3×5 min),滴加 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h,Image ProPlus 软件对条带进行定量分析,每组重复 3 次实验。

1.3.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 取对数生长期细胞,提取细胞总 RNA,后反转录为 cDNA。设计引物序列:SK2 上游引物 5'-ATTGTCCG-CAGCGTAAGCTA-3',下游引物 5'-TGCCAT-AGAGACTCATCAGAGCG-3';E2F8 上游引物 5'-CCAACCCTGCTCGGAATA-3',下游引物 5'-

TTTCTGGCTCATTACCT-3'; β -actin 为内参,上游引物 5'-AATCGTGCCTGACTAATTGGAG-3',下游引物 5'-ACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT-3'。按照荧光定量试剂盒说明书操作,采用 qPCR 仪检测目的基因 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因相对表达量,每组重复 3 次检测。

1.3.6 细胞增殖检测 采用 CCK-8 法检测细胞增殖水平。取对数生长期细胞,接种于 96 孔板内,调整细胞浓度为 1.0×10^3 个/孔,按照试剂盒说明书操作,酶标仪测定波长 450 nm 处光吸光度(A),A 值越大表明细胞数量越多,增殖能力越强,每组重复 3 次。

1.3.7 细胞周期检测 采用碘化丙啶染色法检测细胞周期。取对数生长期细胞,胰蛋白酶消化细胞后,3 000 r/min 离心收集细胞,PBS 缓冲液冲洗(3×5 min),弃上清,70%乙醇重悬细胞,4℃过夜;PBS 缓冲液冲洗(3×5 min);按照碘化丙啶染色试剂盒说明书操作,采用流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料以频数或构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及癌旁组织中 NONO、SKP2 和 E2F8 表达 乳腺癌组织中 NONO、SKP2 和 E2F8 阳性表达率显著高于癌旁组织($P < 0.05$),见表 1。

表 1 乳腺癌组织及癌旁组织中 NONO、SKP2 和 E2F8 的表达情况[n(%)]

组别	n	NONO 阳性	SKP2 阳性	E2F8 阳性
癌组织	43	33(76.74)	28(65.12)	31(72.09)
癌旁组织	43	10(23.26)	12(27.91)	8(18.60)
χ^2		24.605	11.965	24.819
P		0.000	0.001	0.000

2.2 NONO 沉默效率检测 MCF-7 组、sh-NC-MCF-7 组和 sh-NONO-MCF-7 组细胞 NONO 蛋白相对表达量分别为 0.71 ± 0.22 、 0.72 ± 0.21 、 0.12 ± 0.04 。与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组细胞 NONO 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$),提示成功构建 NONO 沉默 MCF-7 细胞株。见图 1。

2.3 沉默 NONO 对乳腺癌细胞增殖能力的影响 与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组细胞比较,sh-NONO-MCF-7 组细胞增殖能力降低($P < 0.05$),见图 2。

2.4 沉默 NONO 对乳腺癌细胞周期的影响 与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组细胞比较,sh-NONO-MCF-7 组 G_0/G_1 期细胞比例显著增加,S 期和 G_2/M 期细胞比例显著降低($P < 0.05$),见图 3。

2.5 沉默 NONO 对乳腺癌细胞 SKP2 和 E2F8 表达的影响 Western blot 检测显示,与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组 SKP2 和 E2F8 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);qPCR 检测显

示,与 MCF-7 和 sh-NC-MCF-7 组比较,sh-NONO-MCF-7 组 SKP2 和 E2F8 mRNA 相对表达水平降低($P < 0.05$)。见图 4。

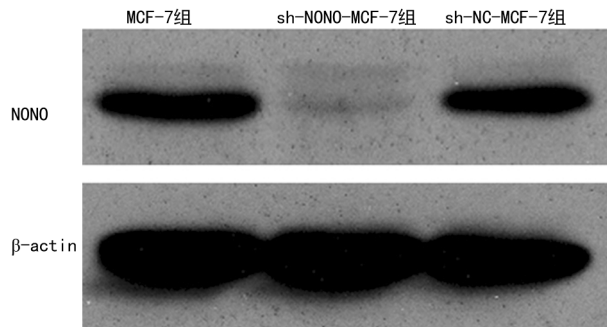


图 1 NONO 沉默效果检测

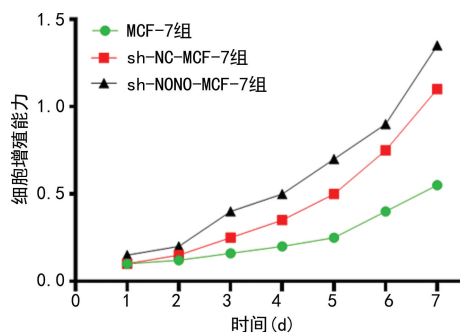


图 2 沉默 NONO 对乳腺癌细胞增殖能力的影响 (CCK-8 法)

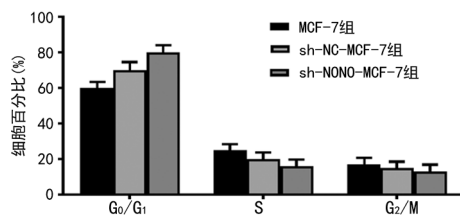
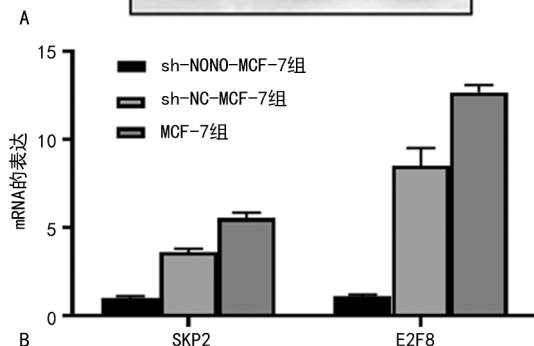
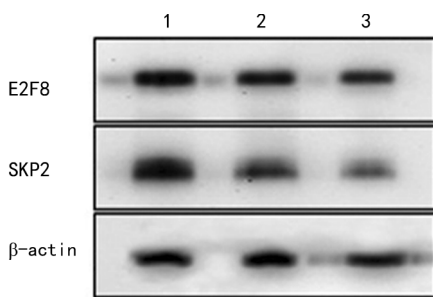


图 3 沉默 NONO 对乳腺癌细胞周期的影响



注:A 图中的 1 为 MCF-7 组,2 为 sh-NC-MCF-7 组,3 为 sh-NONO-MCF-7 组;A 为 Western blot 检测图;B 为 qPCR 检测结果。

图 4 沉默 NONO 对乳腺癌细胞 SKP2 和 E2F8 表达

3 讨 论

近年乳腺癌总生存率和无病生存率均呈现出显著上升趋势,但仍有一部分患者预后较差^[7]。恶性肿瘤发生、发展过程中存在 RNA 动态失衡^[8]。RBP 是一类 RNA 代谢过程中的重要调控蛋白质分子。既往研究表明,癌组织中 RBP 相对于癌旁组织异常表达,且与预后密切相关^[9]。NONO 是 RBP 重要成员之一。HU 等^[10]研究发现,NONO 水平在肝细胞癌患者中异常上调,并与不良预后有关,基因敲除 NONO 后,肝癌细胞增殖、迁移受到显著抑制。另有研究发现,NONO 可参与非小细胞肺癌细胞泛素化,进而影响细胞增殖、迁移和侵袭^[11]。因此,猜测 NONO 有可能通过泛素化等途径影响乳腺癌细胞生物学活动。SKP2 为近年发现的可促进肿瘤细胞周期进展和细胞增殖的癌蛋白。研究发现,下调 SKP2 可诱导细胞周期阻滞,同时有效抑制乳腺癌细胞增殖^[12]。E2F8 为 E2F 家族重要成员。研究发现,E2F8 在乳腺癌组织中的表达显著上调,其水平升高与患者总体生存率和无复发生存率显著相关^[13]。邢振义等^[14]研究发现,E2F8 在胶质瘤中存在显著高表达现象,可促进胶质瘤细胞增殖。

本研究中,乳腺癌组织中 NONO、SKP2 和 E2F8 阳性表达率显著高于癌旁组织,符合以往研究结果^[12,15],表明 NONO、SKP2 和 E2F8 表达上调可能参与了乳腺癌发生或发展。转染 sh-NONO 至 MCF-7 细胞后,细胞 NONO 蛋白表达量显著降低,提示成功构建 NONO 沉默 MCF-7 细胞株。进一步研究发现,转染 sh-NONO 后细胞增殖能力显著降低,G₀/G₁ 期细胞比例显著增加,S 期和 G₂/M 期细胞比例显著降低,提示 NONO 基因敲除可显著抑制乳腺癌细胞增殖,并诱导细胞周期阻滞,NONO 有可能成为乳腺癌治疗的新靶点。为阐明其作用机制,本研究发现,无论是蛋白还是 mRNA,转染 sh-NONO 后细胞 SKP2 和 E2F8 表达均显著降低,表明沉默 NONO 可能是通过下调 SKP2 和 E2F8 达到以上抗肿瘤作用的。

综上所述,沉默 NONO 表达可通过下调 SKP2 和 E2F8 表达,诱导细胞周期阻滞,从而抑制乳腺癌细胞增殖。

参考文献

[1] 朱磊,孙茜,奚佩雯,等.乳腺癌组织中 RNA 结合蛋白 38 的表达与远处转移及预后的关系[J].中华肿瘤杂志,2018,40(8):600-603.

[2] ALFANO L,CAPORASO A,ALTIERI A,et al. NONO

ubiquitination is mediated by FBW7 and GSK3 β via a de-gron lost upon chromosomal rearrangement in cancer[J]. J Cell Physiol,2018,233(5):4338-4344.

- [3] DING L,LI R,HAN X,et al. Inhibition of Skp2 suppresses the proliferation and invasion of osteosarcoma cells [J]. Oncol Rep,2017,38(2):933-940.
- [4] SLADKY VC,KNAPP K,SORATROI C,et al. E2F-family members engage the PIDDosome to limit hepatocyte ploidy in liver development and regeneration [J]. Dev Cell,2020,52(3):335-349.
- [5] LI C,DU L,REN Y,et al. SKP2 promotes breast cancer tumorigenesis and radiation tolerance through PDCD4 ubiquitination[J]. J Exp Clin Cancer Res,2019,38(1):76-79.
- [6] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范:2019 年版[J]. 中国癌症杂志,2019,29(8):609-679.
- [7] 李君,黄小云,李艳珍,等. 彩色多普勒超声检查预测新辅助化疗乳腺癌患者的疗效及复发情况[J]. 广州医学院学报,2019,47(6):57-60.
- [8] 姜涛,雷芳红,黄蕴,等. 环状 RNA 与头颈部肿瘤[J]. 中南医学科学杂志,2019,47(3):321-325.
- [9] LUCA A,KULKARNI N,PANERO R,et al. Abstract 2291:RBP, a community for reproducible bioinformatics [J]. Cancer Res,2018,78(13):2291-2291.
- [10] HU Z,DONG L,LI S,et al. Splicing regulator p54nrb / non-POU domain-containing octamer-binding protein enhances carcinogenesis through oncogenic isoform switch of MYC box-dependent interacting protein 1 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2020,72(2):548-568.
- [11] 殷卫兵,杨芳,郭建军,等. 长链非编码 RNA MEF2C-AS1 通过下调 miR-3646 的表达抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的功能机制研究[J]. 中华生物医学工程杂志,2019,25(6):678-684.
- [12] JANG W,KIM T,KOO J S,et al. Mechanical cue-induced YAP instructs Skp2-dependent cell cycle exit and oncogenic signaling[J]. EMBO J,2017,36(17):2510-2528.
- [13] 朱聪慧,任丽. 乳腺转移性癌的体细胞突变基因相关研究 [J]. 海军医学杂志,2019,170(5):408-412.
- [14] 邢振义,张红赟,孙来广. E2F8 在胶质瘤组织的表达及其对胶质瘤细胞增殖的作用[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(10):1949-1951.
- [15] THURLINGS I,MARTÍNEZ-LÓPEZ L M,WESTENDORP B,et al. Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer [J]. Oncogene,2017,36(6):829-839.

(收稿日期:2021-09-23 修回日期:2022-01-01)