

SCP1 对人乳腺癌细胞迁移和增殖的影响及其机制

张亚柯 隋英丽 王梅月 成翠芹 李光勇 王瑞 李军

(聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059)

摘要 SCP1 是一种膜定位的磷酸酶,可以去磷酸化 RNA 聚合酶 II 并沉默神经元基因.目的:探讨 SCP1 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移和增殖能力的影响,并研究其机制.方法:荧光定量 PCR 法检测多种癌细胞中 SCP1 的表达;体外划痕实验检测 SCP1 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响;Transwell™ 细胞侵袭实验检测 SCP1 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响;MTT 法检测 SCP1 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响;Western blot 法检测 SCP1 对细胞信号通路分子 p-AKT 表达的影响.结果:SCP1 多种癌细胞中均有表达;SCP1 能抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移及增殖能力;抑制 SCP1 的表达能显著上调 MDA-MB-231 细胞 p-AKT 的表达.结论:SCP1 可能通过去磷酸化 AKT 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭.

关键词 SCP1;MDA-MB-231 细胞;AKT;细胞迁移

中图分类号 Q279

文献标识码 A

0 引言

羧基端小结构域磷酸酶(Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatases, CTDSP)^[1]又名 SCPs (small CTD phosphatases)^[2],属于含有 Mg²⁺ 结合基序(DXDXT/V)的金属依赖丝氨酸/苏氨酸磷酸酶家族^[3],是一类物种进化上高度保守的转录共阻遏子,它们最早被发现非神经细胞中能够沉默的神经元基因表达^[4].其家族成员 SCP1、SCP2 和 SCP3 能够通过去磷酸化来调节 Smad1 的羧基端和 Smad 1/2/3 连接区的磷酸化,从而拮抗细胞内信号网络的交叉,进而促进 TGFβ 和抑制 BMP 通路的信号转导.另外,它们还可以去磷酸化 SNAIL、PML 及 c-MYC 等原癌蛋白,参与癌症的发生,发展和转移过程^[5,6].SCP1 基因组结构包含 7 个外显子,编码 2655 bp 的成熟 mRNA,其开放阅读框为 783 bp,编码蛋白含有 261 个氨基酸,分子量为 29.2 kDa,SCP1 能够识别底物蛋白分子上保守的 SP 序列,通过去磷酸化来调控靶蛋白,进而发挥其生物学活性^[7].2014 年,WHO 最新发布的《全球癌症报告》表明,乳腺癌已经成为全球女性中发病率最高,死亡人数第二高的癌症.转移是治疗乳腺癌需要解决的难题之一,而乳腺癌肿瘤细胞迁移能力与乳腺癌的转移密切相关^[8].已有报道,抑制或下调 SCP1 的表达可以促进肝癌等多种肿瘤细胞迁移和增殖,但其对乳腺癌细胞迁移和增殖的影响及其可能的机制尚未完全阐明.因此,本文以高转移性恶性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 为模型,通过下调 SCP1 的表达来观察细胞迁移和增殖能力的变化及其可能机制,来进一步阐明为乳腺癌的转移机制,并为乳腺癌治疗提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

细胞株 HEK293T、MDA-MB-231、MCF7、HeLa、HCT8、HCT116 等购自中国科学院上海细胞库;L15 培养基、胎牛血清、胰酶等细胞培养相关试剂购自美国 Thermo(Gibco)公司;细胞转染试剂盒 Lipofectamine[®] 2000 和总 RNA 提取试剂盒 TRIzol[®] Reagent 购自美国 Thermo(Invitrogen)公司;PrimeScript RT 反转

收稿日期:2018-09-29

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81402512,31401217);山东省研究生教育创新计划项目(SDY14016);山东省高等学校科研计划项目(J13LK17)资助

通讯作者:李军,男,汉族,博士,副教授,研究方向:免疫学、肿瘤免疫与靶向治疗,E-mail:think_a@163.com.

录试剂盒, SYBR^R Premix Ex TaqTM II 等 PCR 相关试剂购自日本 Takara 公司; 多克隆兔抗人 p-AKT (ser473)、AKT 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 溴酚蓝、Tween 20、乙二胺、MTT (3-(4,5)-dimethylthiazolium(-z-y1)-3,5-di-phenyltetrazolium-romide)、四乙酸二钠 (EDTA · 2Na)、多聚甲醛、SDS、丙烯酰胺等生化试剂和试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; Nanodrop 微量分光光度计、荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司; Odyssey 双色红外成像系统购自 Gene 公司, 蛋白免疫印迹实验所用硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自美国 Whatman 公司; Transwell 小室和各种细胞培养皿、培养板购自美国 Corning 公司和 NEST 公司; RNase Free 枪头、EP 管等购自美国 AXYGEN 公司。

1.2 细胞培养及转染

MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 双抗的 L15 培养基, 37 °C, 无 CO₂ 培养。显微镜下观察细胞的生长状态, 融合度达到 80%~90% 即可传代; 传代用 0.25% 胰酶消化细胞制备单细胞悬液, 等体积完全培养基终止胰酶反应, 进行细胞计数, 将含有适当细胞数量的细胞悬液接种到培养瓶、培养皿或细胞培养板中, 补足培养基, 37 °C, 无 CO₂ 培养。接种第二天, 细胞融合度达到 50% 左右, 更换培养基为无血清培养基, 使用 Lipofectamine 2000 试剂进行转染, 转染后 4-6 h 将为无血清培养基更换为有血清的培养基, 48-72 h 后收样。所用 siRNA 序列为: 人 siSCP1: 5'-GCCGGUUGGGUCGAGACCUTT-3', siNC (negative control): 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 上述 siRNA 由上海吉玛公司合成。

1.3 RNA 提取和荧光定量 PCR

收集细胞, 用 Trizol 试剂提取总 mRNA, 利用 PrimeScript RT 反转录试剂盒 (Takara) 反转录制备互补脱氧核糖核酸 (cDNA), -20 °C 保存, 或直接用于后续荧光定量 PCR 实验。所用引物序列为: β -actin: sense: 5'-TCCACGAAACTACCTTCAACTC-3', antisense: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'; hSCP1: sense: 5'-GAGCCATCCCTAAGCAGAC-3', antisense: 5'-CATTTGTCCAGCAGGTTCAG-3'。上述引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Takara) 试剂盒进行半定量 PCR 分析, 所得产物经琼脂糖凝胶电泳检测。使用 SYBR^R Premix Ex TaqTM II (Takara) 试剂盒进行荧光定量 PCR 检测, β -actin 作为内参基因, 经 2^{- $\Delta\Delta$ ct} 方法计算目的基因相对表达量。

1.4 MTT 检测 SCP1 对乳腺癌细胞的增殖能力的影响

用 MTT 比色法检测 SCP1 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响。MDA-MB-231 细胞用 L15 培养基培养, 前一天接 6 孔板, 第二天长到融合度 50% 左右, Lipofectamine 2000 转染 SCP1 特异性 siRNA, 每组 5 个复孔。转染 48 h 后, 胰酶消化平行接种到 5 块 96 孔板中, 每孔 1000 个细胞, 37 °C 培养 24 h 后, 每孔加 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL) 培养。MTT 处理 4 h 后, 终止培养, 小心吸走培养基上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 充分溶解结晶物。使用多功能酶标仪 490 nm 的波长测定每孔吸光值, 同时设置调零孔, 对照孔, 连续测定 5 d, 重复试验 3 次。

1.5 细胞迁移实验检测 SCP1 对癌细胞的迁移能力的影响

细胞迁移实验检测干扰 SCP1 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移能力的影响, 取处于对数生长期状态良好的 MDA-MB-231 细胞, 均匀接种于六孔板中, 接种第二天细胞生长到融合度 50% 左右, 用 Lipofectamine 2000 转染 SCP1 特异性 siRNA, 当细胞融合度接近 90% 时, 用 0.5 g/mL 的丝裂霉素 C 2 μ L/孔预处理 1 小时 (MMC 终浓度为 0.5 ng/mL)。用灭菌的 1 mL 移液器吸头 (tip) 在细胞培养面横竖划两条相交的线, 吸去原来的培养基, 用 PBS 冲洗两次去掉散落的细胞, 补充培养基, 37 °C 培养。取不同时间段, 在光学显微镜下观察 MDA-MB-231 细胞划痕“愈合”情况并拍照, 重复试验 3 次。

1.6 TranswellTM 细胞侵袭实验检测 SCP1 对癌细胞侵袭能力的影响

TranswellTM 细胞侵袭实验检测干扰 SCP1 表达对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭能力的影响。0.1% 的明胶包被 TranswellTM 小室上室面, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗三遍。取处于指数增殖期的 MDA-MB-231 细胞用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液, 用 PBS 和无血清培养基洗涤、并悬浮细胞并计数, 每个 Transwell 小室

上室接种 4×10^4 个细胞(24 孔板),小室上室加 200 μL L15 培养基;下室加入 600 μL 含有 EGF (10 ng/mL) 的 L15 培养基. 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h,吸走小室上室培养液,用棉签将上室面的细胞擦掉,用 4% 预冷多聚甲醛常温固定 10 min,结晶紫染色 30 min,PBS 充分洗净浮色后,在光学显微镜下对小室下室面选取 5 个视野进行观察并细胞记数. 设两个实验组,重复实验 3 次.

1.7 Western blot 检测 SCP1 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 AKT 信号通路相关蛋白的表达

转染 SCP1 干扰 RNA 72 h 后,收取 MDA-MB-231 细胞,PBS 清洗 2 次,加入细胞裂解缓冲液 RIPA buffer,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12000 g,离心 15 min. 转移上清到新的 EP 管中,BCA 法定量总蛋白,加入 4 \times SDS Loading buffer,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min,12000 g 离心 5 min. 按每泳道 20 μg 总蛋白量上样,依次进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)变性胶电泳分离蛋白和蛋白质印迹电泳将蛋白转移至醋酸纤维素膜(NC 膜). 5% 脱脂牛奶,封闭 NC 膜 1 h; 1:1000 稀释一抗孵育,室温 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBST 洗膜 10 min/次,三次. 带有荧光标记的 Odyssey 系统专用二抗避光孵育 1 h,PBST 洗膜 10 min/次,三次,Odyssey 双色红外成像系统扫描 NC 膜,根据实验要求选择不同的曝光时间.

1.8 方法

应用 SPSS 软件对实验所得数据进行统计分析,两组数据差异性比较采用 Unpaired Student's t-test 进行分析,多组数据分析采用 one-way ANOVA Newman-Keuls 方法分析. *, $P < 0.05$ 表示差异具统计学意义; **, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性, $P > 0.05$ 则表示差异无统计学意义.

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 检测 SCP1 在不同细胞中的表达水平

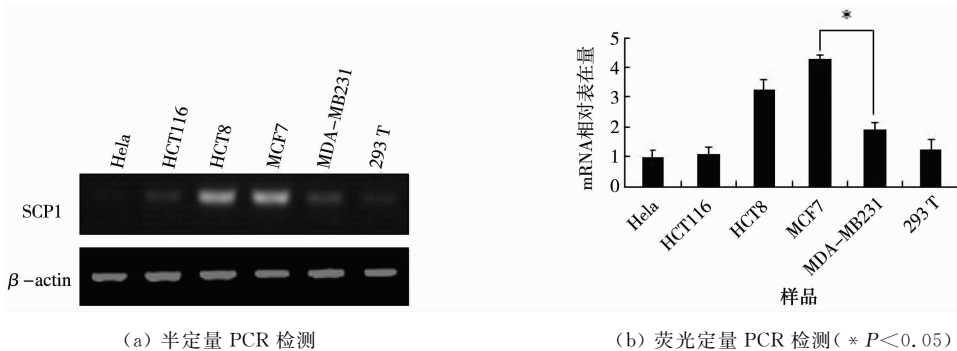


图 1 hSCP1 在不同细胞中的表达差异

从 HEK293T,MDA-MB-231,MCF7,HCT8,HCT116,HeLa 细胞中提取总 RNA. 利用 PrimeScript RT 试剂盒反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板分别通过半定量 PCR 及荧光定量 PCR 检测 hSCP1 在六种细胞中的表达情况. 结果如图 1 所示,可知 SCP1 在多种癌细胞中均表达. 分析实验结果可知,SCP1 在低迁移乳腺癌细胞株 MCF7 和高迁移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 表达有较大差异,推测 SCP1 可能与人乳腺癌细胞迁移相关.

2.2 检测 SCP1 沉默对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖能力的影响

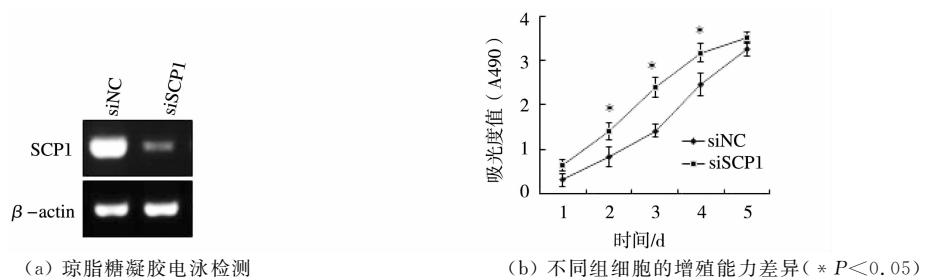


图 2 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖能力的影响

为检测 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖能力的影响,siNC 和 siSCP1 转染 48 h,裂解细胞

并提取 RNA,反转录后 PCR 检测 SCP1 表达的变化. 结果如图 2(a)电泳所示, siSCP1 可以成功的干扰 SCP1 的表达. 同时按细胞以 1000 个/孔浓度,接种于 96 孔板中,连续测定 5 d,在 490 nm 的波长下测定 OD 值读数. 结果如图 2(b)所示,可知,当抑制 SCP1 表达后,MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖能力明显增强($P < 0.05$),说明 SCP1 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖.

2.3 检测 SCP1 沉默对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞迁移能力的影响

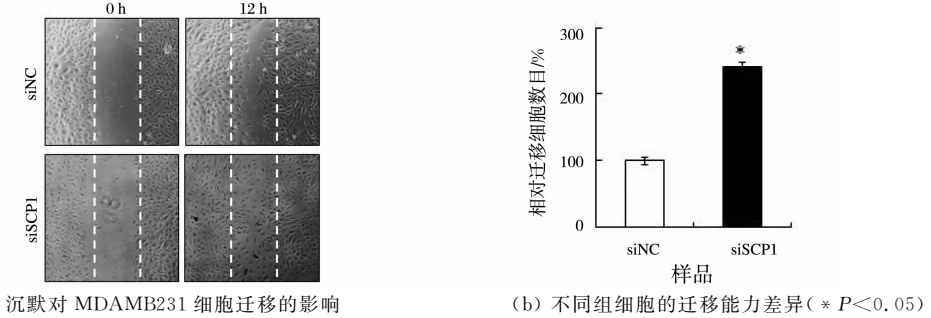


图 3 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移能力的影响

为检测 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移能力的影响, siNC 和 siSCP1 转染 48 h,对细胞进行计数,按 4×10^5 /孔将细胞接种到六孔板中,当细胞融合度接近 90%时,用 0.5 mg/mL MMC 处理,抑制其增殖,划痕拍照,其中虚线内的面积代表原始划线面积. 结果如图 3 所示,当抑制 SCP1 表达后,随着时间的增加,MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移能力明显增强($P < 0.05$),说明 SCP1 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移.

2.4 检测 SCP1 沉默对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞侵袭能力的影响

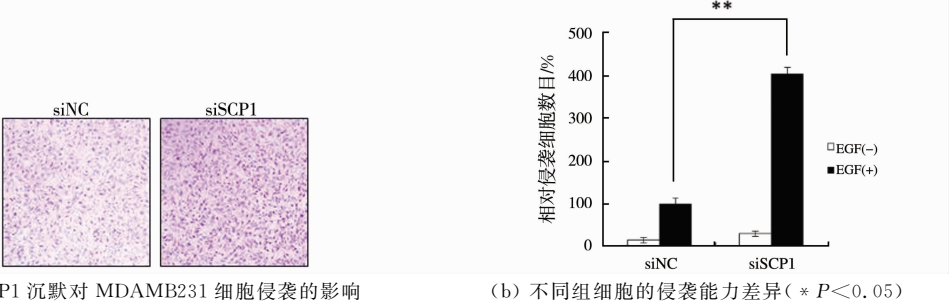


图 4 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭能力的影响

为检测 SCP1 沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭能力的影响, siNC 和 siSCP1 转染 48 h,细胞计数,每个 Transwell 小室上室接入 4×10^4 个细胞,下层溶液中 EGF 浓度为 10 ng/mL 的 L15 培养基诱导. 37℃ 培养 4 h 后,结晶紫染色,显微镜下随机选取视野进行细胞计数. 结果如图 4 所示,当抑制 SCP1 表达后,与 siNC 相比,人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 垂直方向的迁移明显减少($P < 0.01$),说明 SCP1 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的侵袭.

2.5 检测 SCP1 沉默对 AKT 信号通路的影响

用 Western blot 实验检测 SCP1 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞信号通路的影响发现, siNC 和 siSCP1 转染 72 h 后,收集细胞,结果如图 5 所示,当抑制 SCP1 表达后,与 siNC 相比, siSCP1 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 p-AKT 的蛋白水平明显高于 siNC. 由此推测,在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞中,磷酸酯酶 SCP1 可以去磷酸化 AKT 473 位丝氨酸.

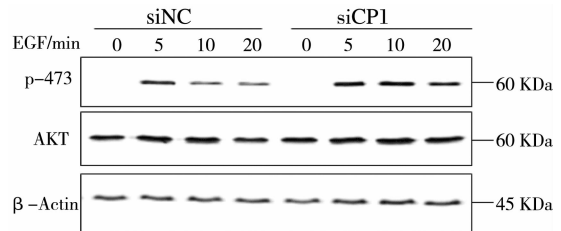


图 5 SCP1 沉默对 AKT 信号通路的影响

3 讨论

目前乳腺癌已经成为威胁女性健康的第一大疾病,呈低龄化、高扩张、高复发状态^[9].包括乳腺癌在内的恶性肿瘤的主要致死原因在于肿瘤转移,肿瘤细胞的迁移与侵袭能力与肿瘤的转移密切相关,进而与肿瘤的恶性程度及预后密切相关^[10].细胞迁移能力的机制十分复杂,因此对乳腺癌为代表的癌细胞转移的细胞分子机制进行深入研究具有重要的理论和实际意义.SCP1 对人乳腺癌细胞迁移及增殖能力的影响及其机制目前尚未阐明.在本研究通过 MTT 实验、细胞划痕迁移实验及 Transwell 细胞侵袭实验表明,抑制 SCP1 表达可以使人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖能力,迁移能力及侵袭能力均明显增强.

AKT 相关的细胞信号通路是经典的人类肿瘤相关信号通路,众多研究发现包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤存在 AKT 通路异常激活,证明了 AKT 信号通路异常活化与恶性肿瘤发生的相关性^[11].研究表明,磷酸酯酶 SCP1 在人脐静脉内皮细胞中可以发生棕榈酰化,定位到细胞膜上去磷酸化 AKT,从而抑制血管内皮细胞的新生、迁移和侵袭^[12].另外 AKT 信号通路失活能抑制肿瘤细胞的增殖和迁移能力^[13-15].Western blot 结果表明,抑制乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的 SCP1 表达后,AKT 蛋白磷酸化水平明显高于对照组.这说明,下调乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 SCP1 表达后明显增强的癌细胞细胞迁移及增殖能力可能是通过 AKT 通路来实现的.由此推测,SCP1 或许将来可以成为乳腺癌治疗的重要靶点分子,为将来开发以 SCP1 为靶点的靶向化疗药物提供了新的思路,SCP1 靶向药物的研发结合 SCP1 基因在乳腺癌患者的人体化基因诊断或许为将来乳腺癌的精准治疗提供新靶点.

参 考 文 献

- [1] Marquet S, Lepage P. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 generegion on Chromosome region 2q35[J]. Mammalian Genome, 2000, 11(9): 755-762.
- [2] Yeo M. A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine[J]. J Boil Chem, 2003, 278(28): 26078-26085.
- [3] Kamenski T, Heilmeier S, Meinhart A, et al. Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases[J]. Molecular Cell, 2004, 15(3): 399-407.
- [4] Yeo M, Lee SK, Lee B, et al. Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression[J]. Science, 2005, 307(5709): 596-600.
- [5] Sapkota G, Knockaert M, Alarcon C, et al. Dephosphorylation of the linker regions of Smad1 and Smad2/3 by small C-terminal domain phosphatases has distinct outcomes for bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta pathways[J]. J Boil Chem, 2006, 281(52): 40412-40419.
- [6] Thompson J, Lepikhova T, Teixido-Travesa N, et al. Small carboxyl-terminal domain phosphatase 2 attenuates androgen-dependent transcription[J]. Embo, 2006, 25(12): 2757-2767.
- [7] 廖鹏. 磷酸酯酶 SCP1 调控 c-Myc 蛋白去磷酸化及相关生物学功能的研究和 SCP1 细胞膜定位的发现及其棕榈酰化修饰的研究[D]. 上海:华东师范大学,2012.
- [8] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志,2013,23(8):561-569.
- [9] 赵文静,旺建伟,隋方宇,等. 乳腺增生病与乳腺癌病因相关性研究[J]. 中医学报,2015,43(3):28-30.
- [10] 李勇杰,于庆龙,潘际刚,等. 酒精对乳腺癌细胞表皮生长因子受体-钙激活中性蛋白酶通路及细胞迁移的影响[J]. 中国癌症杂志,2016, 26(10):820-825.
- [11] Hemmings B A, Restuccia D F. The PI3K-PKB/Akt pathway[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2015, 7(4):95-101.
- [12] Liao P, Wang W, Li Y, et al. Palmitoylated SCP1 is targeted to the plasma membrane and negatively regulates angiogenesis[J]. Elife, 2017, 6:38-42.
- [13] Testa J R, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20):10983-10985.
- [14] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, et al. PI3K/AKT/PTEN signaling as a molecular target in leukemia angiogenesis[J]. Adv Hematol, 2012, 2012: 843085.
- [15] 刘思畅,邹志鹏,邴俊,等. 蛋白激酶蛋白家族的功能研究进展[J]. 医学研究生学报,2011,24(2):208-211.

The Effect of SCP1 and Its Mechanisms on the Migration and Proliferation of Human Breast Cancer Cells

ZHANG Ya-ke SUI Ying-li WANG Mei-yue CHENG Cui-qin

LI Guang-yong WANG Rui LI Jun

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract SCP1 as a membrane located phosphatases acts globally to silence neuronal genes and to affect the dephosphorylation of RNA Pol II. **Objective:** To investigate the effect and the relevant molecular mechanisms of SCP1 on the migration and proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cell. **Methods:** The expression of SCP1 in various cancer cells was measured by qRT-PCR. MTT assay was used to evaluate the proliferation capacity in different MDA-MB-231 breast cancer cells. The effects of SCP1 on the expression of p-AKT in MDA-MB-231 cells were examined by Western blotting. In vitro wound healing assay and TranswellTM assay were utilized to measure the effects of SCP1 on the migration and invasion capability of MDA-MB-231 cells. **Results:** Suppressed SCP1 significantly promoted the migration and proliferation of MDA-MB-231 cells. Inhibition of SCP1 did not affect the expression of total AKT, whereas the phosphorylated AKT level was markedly up-regulated. **Conclusion:** SCP1 could inhibit the migration and proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cell via dephosphorylation of AKT.

Key words SCP1; MDA-MB-231 cell; AKT; cell migration

(上接第 10 页)

Determination of Adhesive Property and Release Behaviors of Fufang Danshen Adhesive Pellets

WANG Zhen^{1,2} ZHAO Zhuang¹ LI Peng-yue¹ DU Shou-ying¹

SUN Jing¹ LU Yang¹ BAI Jie¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Jining Hospital of TCM, Jining 272000, China)

Abstract To optimize the adhesive material of Fufang Danshen adhesive pellets, adhesion experiments and release experiments of different pharmaceutical excipients were carried in vitro. Pellets prepared with HPMC, chitosan, and HPMC/chitosan were evaluated by in vivo and in vitro intestinal adhesion tests and compared with general pellets prepared with microcrystalline cellulose. The results showed that HPMC/chitosan group had highest adhesion index. Release behaviors of different ingredients of different groups were investigated by dissolution test. The results showed that Sal B, Panax saponins, and Tanshinone II A were released sustained within 12 h. The cumulative release of Sal B was up to 80% within 12 h; notoginsenoside R1, and ginsenoside Rg1 were released completely; ginsenoside Rb1 was released up to 84.23%; and ginsenoside Rd was released up to 81.93% within 12 h. Tanshinone II A was released about 48.02% within 12 h.

Key words Fufang Danshen pellets; in vitro adhesive; in vivo adhesive; dissolution test