

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.004

AIB1 基因沉默对三阴性乳腺癌细胞生长抑制和凋亡的影响

王波¹, 董小林²

(湖北医药学院 1. 附属东风医院器官移植乳腺外科; 2. 附属人民医院健康管理中心, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 分析RNAi介导的乳腺癌扩增基因1(amplified in breast cancer 1, AIB1)基因沉默对三阴性乳腺癌细胞生长抑制和凋亡的影响。方法: 设计、合成沉默AIB1基因的特异shRNA(短发卡RNA), 构建重组表达质粒, 转染三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231, 蛋白质印迹法检测转染后AIB1蛋白质表达的变化; MTT法检测细胞的生长抑制情况, 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。结果: 本实验成功构建了靶向AIB1基因的RNAi重组表达质粒, 并稳定转染三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231。蛋白质印迹法结果表明: 稳定转染组AIB1基因的蛋白质表达抑制率为70%, 与未转染组相比差异有统计学意义($P < 0.05$); AIB1基因沉默三阴性乳腺癌细胞24, 48, 72 h的OD值分别为 24.363 ± 0.501 , 32.596 ± 0.348 及 43.408 ± 0.257 , 凋亡率分别为 $(8.713 \pm 0.106)\%$, $(11.396 \pm 0.147)\%$ 及 $(14.110 \pm 0.117)\%$, OD值各组间差异有统计学意义($F = 43.436$, $P < 0.001$); 凋亡率各组间差异有统计学意义($F = 79.751$, $P < 0.001$)。结论: AIB1基因沉默可明显抑制三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的生长和促进凋亡。

[关键词] 乳腺癌扩增基因1; 基因沉默; 三阴性乳腺癌; 抑制; 凋亡

Growth inhibition and apoptosis induction of AIB1 gene in triple-negative breast cancer cells in vitro

WANG Bo¹, DONG Xiaolin²

(1. Department of Organ Transplantation and Breast Surgery, Affiliated Dongfeng Hospital; 2. Department of Physical Examination Center, Affiliated People's Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the silencing effects of amplified in breast cancer 1 (AIB1) gene via RNAi on the proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods:** According to cDNA sequence of the AIB1 gene, the shRNA which specified silencing AIB1 gene was designed and synthesized, then transfected into MDA-MB-231 cells. The expression levels of AIB1 gene was detected by Western blotting analysis after transfection. MTT assay was applied to evaluate the cell proliferation, flow cytometry assay was conducted to estimate cell apoptosis after being transfected. **Results:** Our experiments successfully built a recombinant expression plasmid which specified targeting AIB1 gene via RNAi in MDA-

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-27

通信作者 (Corresponding author): 董小林, Email: newestway@163.com

MB-231 cells. After transfecting, the protein relative levels of *AIB1* in *AIB1* gene silencing group were significantly lower as compared with the blank group ($P<0.05$). The OD value and apoptosis rate in *AIB1* gene silencing group after 24, 48 and 72 h were 24.363 ± 0.501 , 32.596 ± 0.348 , 43.408 ± 0.257 and $(8.713\pm 0.106)\%$, $(11.396\pm 0.147)\%$, $(14.110\pm 0.117)\%$, respectively, the difference were statistically significant between two groups ($F=43.436$, $P<0.001$; $F=79.751$, $P<0.001$). **Conclusion:** Silencing *AIB1* gene can inhibit breast cancer cell proliferation and promote its apoptosis.

Keywords *amplified in breast cancer 1*; gene silencing; triple-negative breast cancer; inhibition; apoptosis

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤，也是女性死亡的主要原因之一。在欧洲、北美等发达国家，乳腺癌的发病率居女性恶性肿瘤的首位^[1]。在我国，乳腺癌的发病率和病死率持续上升，尤以上海、北京、天津及沿海地区为著^[2]。

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)，雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均阴性，占全部乳腺癌病例的15%~20%，与非三阴性乳腺癌相比，有效治疗方法少，易复发，预后差等特点。目前针对三阴性乳腺癌开展了大量的基础和临床研究^[3]，但收效甚微。如何更好地提高三阴性乳腺癌的治疗效果，是目前亟待解决的难题。因此，积极探索针对三阴性乳腺癌有效的治疗方法，显得尤为重要。

乳腺癌扩增基因1(amplified in breast cancer 1, *AIB1*)是一种潜在的致癌因子，与包括乳腺癌在内多种恶性肿瘤的发生、发展有密切的关系^[4]。本课题组前期研究^[5]明确*AIB1*高表达与三阴性乳癌患者不良预后相关。本研究通过RNAi介导*AIB1*基因沉默，分析其对三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231生长抑制和凋亡的影响，为拓展三阴性乳腺癌的治疗方法提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、感受态大肠杆菌(top10)、PSUPER RNAi Vectors(RNAi转染质粒)均由中山大学生命科学学院进化遗传学与基因组学实验室提供；胎牛血清、DEME培养基、0.25%胰蛋白酶、LipofectamineTM2000及Annexin V-FITC均购自美国Sigma公司；*AIB1*基因1抗购自武汉博士德生物技术有限公司；质粒小提取试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231细胞为贴壁单层生长的细胞，培养基为DMEM加10%FBS。细胞置于37℃，5%CO₂培养箱内培养。隔日换液，2~3 d传代1次，细胞消化使用0.25%胰酶。所有操作在超净台进行。

1.3 *AIB1* 基因 RNAi 序列设计

根据RNAi设计原则，从GenBank选取*AIB1*序列，用美国Ambion公司提供的在线设计软件(<http://www.ambion.com>)设计目标序列，进行BLAST分析，保证所选序列与*AIB1*基因以外的人类其他基因无同源性，分别命名为PsuperRNAi-1, PsuperRNAi-2和PsuperRNAi-3(表1)。

1.4 重组质粒的构建、链接、转化、筛选及鉴定

构建重组质粒载体由中山大学生命科学学院进化遗传学与基因组学实验室保存，所设计的shRNA由深圳华大公司合成。质粒载体自带有HindIII和BglII酶切位点，酶切后即得线性化产物，用于连接反应。将上述连接产物转化感受态TOP10(由中山大学生命科学学院进化遗传学及基因组学实验室制备并保存)。取100 μL加入连接产物摇床震荡后的转化菌液，倒置培养，37℃过夜。培养16 h后观察平板菌落生长情况，筛选出成功转入质粒的菌斑。

将重组质粒PsuperRNAi-1, PsuperRNAi-2, PsuperRNAi-3分别用限制性内切酶HindIII和BglII双酶切，琼脂糖凝胶电泳成像分析。取各重组质粒转化菌液1 mL，送深圳华大基因股份有限公司测序。

1.5 重组质粒的转染和筛选稳定转染的细胞

根据重组质粒的双酶切及测序鉴定，挑选目的重组质粒用于转染MDA-MB-231细胞。用LipofectamineTM2000脂质体转染，转染用6孔板，按说明书进行操作。将转染48 h后的MDA-MB-231

细胞接种至6孔板, 2×10^4 /孔, 加G418进行筛选, 每2~3 d更换含G418的培养液。由于重组质粒自带GFP(绿色荧光蛋白), 用荧光倒置显微镜观察转染细胞GFP的荧光强度。2周后仍存活、生长的细胞即是稳定转染的细胞, 瞬时转染的细胞为转染后48 h的细胞。荧光倒置显微镜观察G418筛选前后的荧光强度, 继续扩大培养, 用于后续实验。

1.6 转染及未转染细胞 AIB1 基因表达的蛋白质印迹法分析

MDA-MB-231细胞未转染组、瞬时转染组(转染后48 h)及稳定转染组蛋白质的提取过程按照试剂盒说明进行, 取所提的蛋白质40 μ L加入5 \times Buffer, 置于沸水中5 min, 将样品上样, 保持电压80 V进行电泳, 10 min后, 电压升至110 V, 继续电泳, 至溴酚蓝达到分离胶的底部, 电转移后的硝酸纤维薄膜放于5%的脱脂奶粉封闭3 h, TBST洗涤2次, 5 min/次, 加2 μ g的AIB1抗体, 对照组加入 β -actin对照蛋白质, 封口后, 室温摇床2 h, 4 $^{\circ}$ C过夜, 次日室温下平衡1 h, TBST洗膜3次, 10 min/次; 加入HRP标记的二抗, 用ImageJ软件

对条带的灰度值进行分析。

1.7 MTT 法检测细胞的生长抑制情况

收集稳定转染的MDA-MB-231细胞, 调整细胞浓度并接种至96孔板上继续培养, 以未转染细胞为阴性对照, 每组6个复孔, 培养24, 48 h及72 h后, 每孔加入5 mg/mL的噻唑蓝(MTT)溶液20 μ L, 4 h后加入200 μ L二甲基亚砷(DMSO), 用酶标仪检测各孔细胞的光密度值(OD值)。

1.8 流式细胞仪检测细胞的凋亡率

转染及未转染MDA-MB-231细胞用PI及Annexin-V-FITC双染色, 行流式细胞仪检测细胞凋亡率, 各组3个复孔。

1.9 统计学处理

采用SPSS 21.0软件行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析(Oneway-ANOVA), LSD- t 行组间两两比较。计数资料用 χ^2 检验或Fisher确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 AIB1基因RNAi序列设计

Table 1 Sequence of RNA interference for AIB1 gene

名称	序列 (5'-3')
PsuperRNAi-1	正向: GATCTGGACCACCGCATCTCTACATTCAAGAGATGTAGAGATGCGGTGGTCCTTTTTA 反向: AGCTTAAAAAAGACCACCGCATCTCTACATCTCTTGAATGTAGAGATGCGGTGGTCCA
PsuperRNAi-2	正向: GATCTACCGCATCTCTACATTCAAGATTCAAGAGATCTTGAATGTAGAGATGCGGTTTTTTA 反向: AGCTTAAAAAACCAGCATCTCTACATTCAAGATCTCTTGAATCTTGAATGTAGAGATGCGGTA
PsuperRNAi-3	正向: GATCTAGCTTACACATCCATCTAGATTCAAGAGATCTAGATGGATGTGTGAAGCTTTTTTA 反向: AGCTTAAAAAAGCTTACACATCCATCTAGATCTCTTGAATCTAGATGGATGTGTGAAGCTA

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定结果

挑选重组质粒PsuperRNAi-2, PsuperRNAi-3, 用HindIII和BGIiII双酶切。PsuperRNAi-2, PsuperRNAi-3重组质粒均可被酶切出目的大小条带。PsuperRNAi-2重组质粒双酶切后的目的条带更清晰、完整, 选择重组质粒PsuperRNAi-2送深圳华大基因股份有限公司测序, 测序结果与设计的目的序列完全一致, 说明重组质粒PsuperRNAi-2构建成功, 故选择PsuperRNAi-2重组

质粒进行下一步实验。

2.2 荧光倒置显微镜观察 G418 稳定转染细胞的 GFP 荧光强度

重组质粒用Lipo脂质体转染MDA-MB-231细胞后, 分别于转染及G418筛选后第2, 7, 14天, 用倒置荧光显微镜观察GFP的荧光强度。随G418筛选时间延长, MDA-MB-231细胞的GFP荧光强度逐渐增强, 到第14天时, 荧光强度到达最强, 说明重组质粒PsuperRNAi-2转染MDA-MB-231, 经G418筛选后, 获得稳定转染的细胞(图1)。

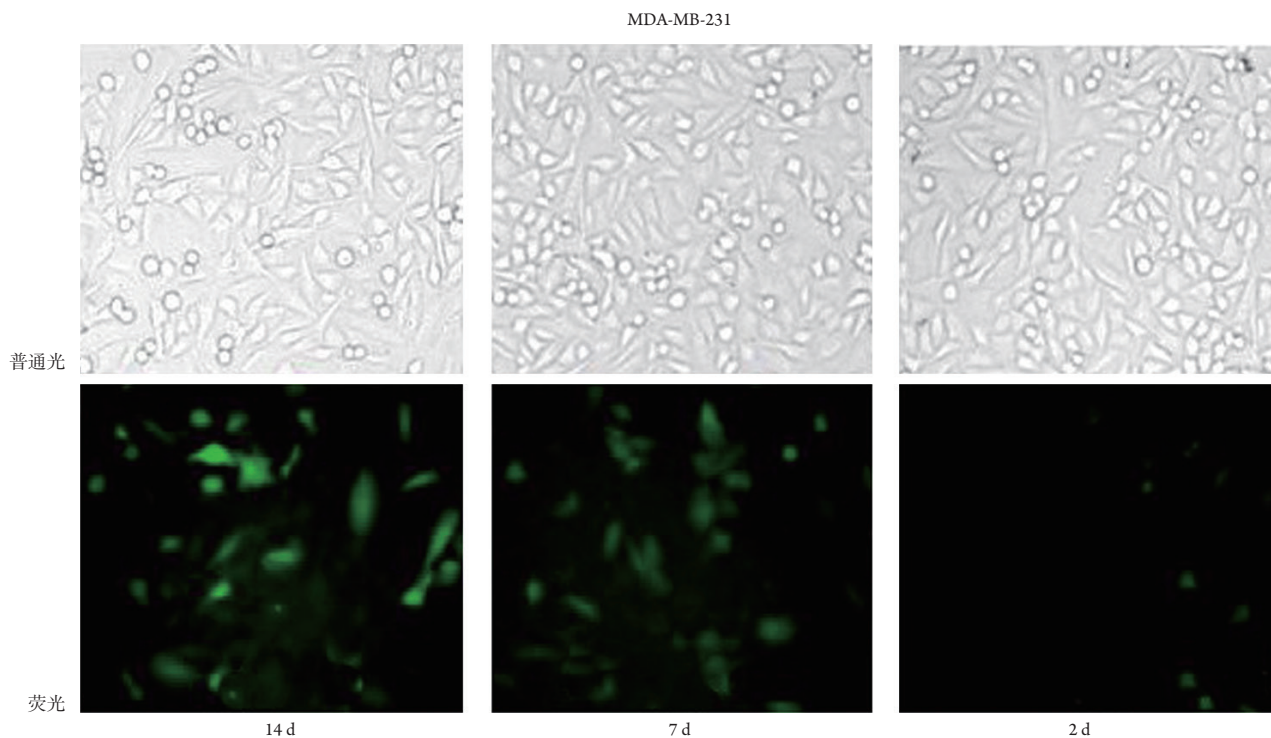


图1 稳定转染细胞荧光倒置显微镜观察($\times 100$, G418筛选后2, 7, 14 d)
Figure 1 Stably transfected with *AIB1* gene ($\times 100$, G418 screening 2, 7, 14 d)

2.3 蛋白质印迹法分析转染及未转染细胞 *AIB1* 表达

*AIB1*蛋白的灰度图像用Image J软件分析, 各组蛋白质的灰度值与 β -actin参照蛋白质灰度值之比即*AIB1*蛋白的表达值。经ImageJ软件分析, 空白对照组蛋白质表达率为85%, 瞬时转染组的蛋白质表达率为68.8%, 而稳定转染组的蛋白质表达率为31.2%(图2)。进一步说明重组质粒PsuperRNAi-2构建成功, 在蛋白质表达水平上, 稳定转染组*AIB1*蛋白表达被有效抑制。

2.4 MTT 检测细胞生长抑制

MDA-MB-231细胞转染24, 48与72 h的OD值分别为 24.363 ± 0.501 , 32.596 ± 0.348 及 43.408 ± 0.257 , 空白对照组24, 48与72 h的OD值分别为 19.446 ± 0.468 , 20.841 ± 0.547 及 22.190 ± 0.514 , 随着转染时间延长, 细胞的生长抑制越明显, 各组间相比, 差异有统计学意义($F=43.436$, $P<0.001$; 图3)。

2.5 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率

MDA-MB-231细胞稳定转染24, 48及72 h与

未转染细胞用PI及Annexin-V-FITC双染色, 行流式细胞仪检测细胞凋亡率, 各组3个复孔。稳定转染细胞的各组凋亡率是(8.713 ± 0.106)%, (11.396 ± 0.147)%及(14.110 ± 0.117)%, 未转染细胞的各组凋亡率是(4.123 ± 0.080)%, (4.496 ± 0.101)%及(4.606 ± 0.072)%, 稳定转染组的细胞凋亡率明显高于未转染组, 差异有统计学意义($F=79.751$, $P<0.001$, 图4)。

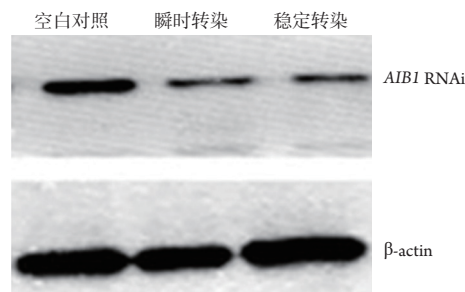


图2 蛋白质印迹法检测MDA-MB-231细胞*AIB1*基因
Figure 2 *AIB1* gene silencing in MDA-MB-231 cells detected by Western blotting

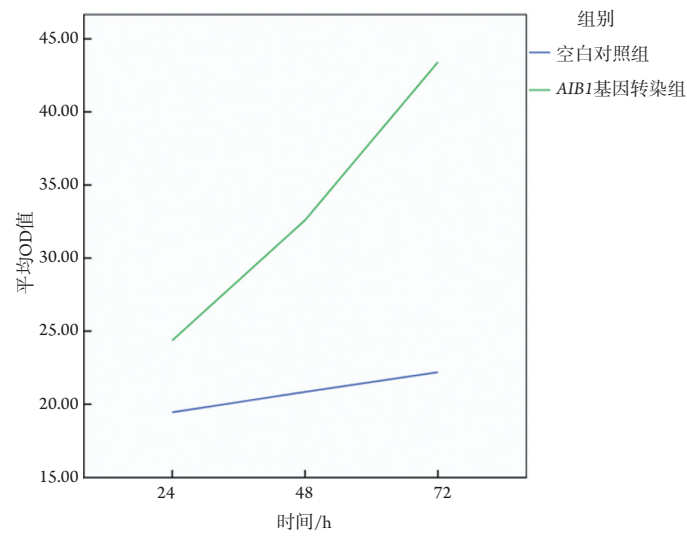


图3 细胞生长曲线的比较

Figure 3 Proliferation inhibition rate of the cells detected by MTT assay

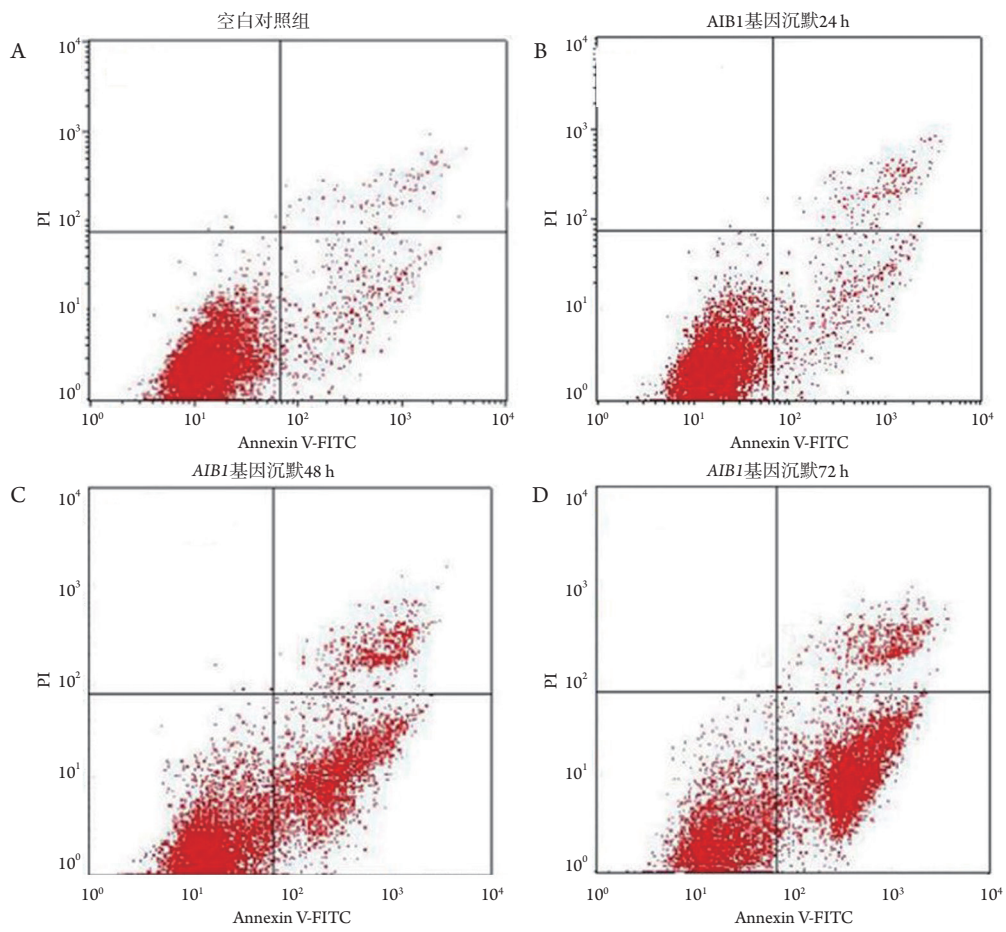


图4 流式细胞仪检测各组的凋亡率

Figure 4 Apoptosis rate tested by flow cytometry

3 讨论

*AIB1*基因定位于人染色体20q12, 是第一个已被证实的共激活因子, 在食管癌、卵巢癌、肠癌、肝癌等多种肿瘤中研究广泛^[5-8], 其异常表达与患者不良预后相关。同时, *AIB1*作为甾体激素受体辅助激活因子, 与女性的生殖功能及乳腺发育有密切关系。因此, *AIB1*在激素依耐性肿瘤中研究较为广泛^[9]。现已有研究^[10-11]表明: *AIB1*高表达通过雌激素依耐的信号转导途径导致ER阳性乳腺癌细胞生长, 与ER阳性乳腺癌的发生发展、内分泌治疗耐药密切相关。早期相关研究明确, *AIB1*是ER阳性乳腺癌他莫昔芬内分泌治疗疗效预测的指标^[12], 并认为*AIB1*高表达只见于ER阳性乳腺癌^[13]。但后期相关研究发现*AIB1*也见于ER阴性乳腺癌^[14], 这与本实验前期研究^[5]结论相一致。国内外近年在胃癌、食管癌等非激素依耐性肿瘤研究^[15]中明确, *AIB1*可通过非激素依耐的途径促进肿瘤细胞的生长、增殖。作为非激素依耐的三阴性乳腺癌, 目前总体治疗效果与非三阴性乳腺癌相比, 易早期复发、转移, 治疗效果差^[15]。本实验前期研究^[5]发现: 在三阴性乳腺癌组织中, 同样存在*AIB1*高表达, 并与三阴性乳腺癌患者的不良预后相关。

由于三阴性乳腺癌的治疗方法较局限, 部分患者因复发、转移, 需接受多次化学药物治疗, 不仅化学药物治疗效果有限, 而且不良反应明显^[16]。而靶向性治疗, 由于其独特的作用机制, 在三阴性乳腺癌的研究中备受青睐^[17]。本研究选用三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231^[18], 在细胞水平证实以*AIB1*为目的基因, 通过RNAi技术成功抑制其在三阴性乳腺癌细胞中的表达, 可显著抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖并促进三阴性乳腺癌细胞凋亡的靶向性抗肿瘤效果, 但具体机制需进一步研究。

综上所述, 沉默*AIB1*基因可抑制三阴性乳腺癌细胞生长, 促进凋亡; *AIB1*基因可作为三阴性乳腺癌潜在的治疗靶点。本研究后期将进行沉默*AIB1*基因的体内、外实验, 对这一结论进行进一步验证。

参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in

- GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
2. 刘红, 荀培, 陈可欣, 等. 天津市近20年女性乳腺癌患者临床病理特点及预后变化趋势分析[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(34): 2405-2407.
- LIU Hong, XUN Pei, CHEN Kexin, et al. The trend of clinical characteristics and prognosis of women's breast cancer 1981—2000[J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 87(34): 2405-2407.
3. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, et al. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973—1997[J]. *Int J Epidemiol*, 2005, 34(2): 405-412.
4. 雷珍, 钟锡明, 周岐, 等. p53, Ki-67及E-钙黏蛋白在三阴性乳腺癌中的表达及预后[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(2): 308-314.
- LEI Zhen, ZHONG Ximing, ZHOU Qi, et al. Expression and prognosis of p53, Ki-67 and E-cadherin in triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Pathology and Clinical Research*, 2017, 37(2): 308-314.
5. 王波, 魏洞, 郭小军, 等. *AIB1*在三阴性乳腺癌中的表达及意义[J]. *海南医学*, 2016, 27(1): 53-55.
- WANG Bo, WEI Jian, GUO Xiaojun, et al. Expression of *AIB1* protein in patients with triple-negative breast cancer and its clinical significance[J]. *Hainan Medical Journal*, 2016, 27(1): 53-55.
6. 李苓, 秦莉, 焦淑红, 等. *AIB1*蛋白在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2017, 44(12): 902-906.
- LI Ling, QIN Li, JIAO Shuhong, et al. Expression and its clinical significance of *AIB1* protein in the tissues of ovarian carcinoma[J]. *Journal of International Oncology*, 2017, 44(12): 902-906.
7. 王逢会, 庞秋霞, 郭贤利, 等. 宫颈癌中*AIB1*蛋白的表达及其临床意义研究[J]. *延安大学学报(医学科学版)*, 2017, 15(3): 5-6.
- WANG Fenghui, PANG Qixia, GUO Xianli, et al. Expression of *AIB1* protein in cervical carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Yan'an University. Medical Sciences*, 2017, 15(3): 5-6.
8. Liang M, Zhao J. Protein expressions of *AIB1*, p53 and Bcl-2 in epithelial ovarian cancer and their correlations with the clinical pathological features and prognosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5134-5139.
9. Narbe U, Sjöström M, Forsare C, et al. The estrogen receptor coactivator *AIB1* is a new putative prognostic biomarker in ER-positive/HER2-negative invasive lobular carcinoma of the breast[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 175(2): 305-316.
10. He L, Deng H, Liu S, et al. Overexpression of amplified in breast cancer 1 (*AIB1*) gene promotes lung adenocarcinoma aggressiveness in vitro and in vivo by upregulating C-X-C motif chemokine receptor 4[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 53.
11. Truong TH, Hu H, Temiz NA, et al. Cancer stem cell phenotypes in ER+ breast cancer models are promoted by PELP1/*AIB1* complexes[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(4): 707-719.

12. Weiner M, Skoog L, Fornander T, et al. Oestrogen receptor co-activator AIB1 is a marker of tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(8): 1994-1999.
13. Alkner S, Jensen MB, Rasmussen BB, et al. Prognostic and predictive importance of the estrogen receptor coactivator AIB1 in a randomized trial comparing adjuvant letrozole and tamoxifen therapy in postmenopausal breast cancer: the Danish cohort of BIG 1-98[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 166(2): 481-490.
14. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 903-907.
15. Burandt E, Jens G, Holst F, et al. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(3): 745-753.
16. 林群, 刘丽铭, 代辉, 等. 三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231中PRMT1通过C/EBP α 调控c-myc表达[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(7): 949-953.
17. LIN Qun, LIU Liming, DAI Hui, et al. PRMT1 regulates the expression of c-myc through C/EBP α in breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2019, 39(7): 949-953.
17. 孟洪涛, 王潍博. 阿帕替尼联合卡培他滨三线治疗晚期三阴性乳腺癌的疗效观察[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2019, 19(6): 670-672.
- MENG Hongrui, WANG Weibo. Efficacy of apatinib combined with capecitabine in treatment of patients with advanced triple-negative breast cancer[J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*, 2019, 19(6): 670-672.
18. 鲍刚, 吴沁航, 高芙蓉, 等. 蓝萼甲素对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1419-1423.
- BAO Gang, WU Qinhang, GAO Furong, et al. Effect of glaucocalyxin A on proliferation and cell cycle of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(6): 1419-1423.

本文引用: 王波, 董小林. AIB1基因沉默对三阴性乳腺癌细胞生长抑制和凋亡的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(5): 1093-1099. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.004

Cite this article as: WANG Bo, DONG Xiaolin. Growth inhibition and apoptosis induction of AIB1 gene in triple-negative breast cancer cells in vitro[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(5): 1093-1099. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.004