

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.25.007

乳腺癌细胞中 HuR 调控 PDGFC 的分子机制研究 *

罗年安^{1,2} 陈玉宝² 武晓军¹ 董 瑞^{1Δ}

(1 第四军医大学附属唐都医院普外科 陕西 西安 710032; 2 解放军第十医院 甘肃 武威 733000)

摘要 目的:探讨乳腺癌细胞中 HuR 调控 PDGFC 的分子机制。**方法:**通过软件预测分析,乳腺癌细胞中 PDGFC 3'UTR 的 HuR 结合位点;在 RNA 免疫共沉淀实验中,加入 PDGFC 刺激后检测 HuR 与 PDGFC mRNA 的相互作用;通过构建 PDGFC 3'UTR 五个截短体,荧光素酶报告基因实验检测 HuR 调控 PDGFC 的结合位点。**结果:**软件预测分析发现,PDGFC 3'UTR 可能存在五个 HuR 结合位点;RNA 免疫共沉淀实验中,当加入 PDGFC 刺激后,HuR 与 PDGFC mRNA 出现免疫共沉淀,证明 HuR 和 PDGFC 之间的直接相互作用;PDGFC mRNA 3'UTR 报告基因系统检测显示,第 2 个和第 4 个位点可与 HuR 结合调控 PDGFC。**结论:**本研究揭示了乳腺癌细胞中 HuR 通过与 PDGFC mRNA 3'UTR 结合调控 PDGFC 的分子机制,为乳腺癌的临床诊断和治疗提供了新的思路。

关键词:乳腺肿瘤;HuR;PDGFC;分子机制

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)25-4828-03

Molecular Mechanism of PDGFC Regulated by HuR in Breast Cancer Cells*

LUO Nian-an^{1,2}, CHEN Yu-bao², WU Xiao-jun¹, DONG Rui^{1Δ}

(1 Department of general surgery, Tangdu Hospital, the fourth military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 The 10 st Hospital of PLA, Wuwei, Gansu, 733000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of PDGFC regulated by HuR in breast cancer cells. **Methods:** Through the software analyses, we first predicted the HuR-binding sites on the PDGFC 3'-UTR in breast cancer cells; An RNA-immunoprecipitation tested the interaction of HuR with the PDGFC mRNA after adding PDGFC stimulation; Luciferase experiments tested the HuR-binding sites of PDGFC regulated by HuR through structuring five truncated of PDGFC 3'UTR. **Results:** We found five HuR-binding sites in the 3'UTR of PDGFC by software prediction; The RNA-immunoprecipitation showed the co-immunoprecipitation of HuR and PDGFC mRNA after adding PDGFC stimulation confirming the direct association of HuR with the PDGFC; Luciferase experiments of PDGFC mRNA 3'UTR showed that PDGFC regulated by the second and fourth HuR-binding sites. **Conclusions:** This study reveals the molecular mechanism of PDGFC regulated by HuR through binding to PDGFC mRNA 3'UTR in breast cancer cells, and provided rationale for the development of strategies in the clinical diagnosis and treatment for breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; HuR; PDGFC; Molecular mechanism

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)25-4828-03

前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率居女性恶性肿瘤之首,死亡率仅次于肺癌,成为女性的“头号杀手”^[1]。乳腺癌发生发展是一个多因素参与的过程,相关信号通路紊乱以及多基因表达失调是重要原因^[2];研究表明,血小板衍生生长因子 C(PDGFC)和人抗原 R(human antigen R, HuR)在乳腺癌细胞中的表达具有正相关性^[3,4]。PDGFC 在多种组织细胞大量表达,包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞中亦广泛表达,最早发现于血小板 α 颗粒;目前研究发现 PDGFC 在促进血管生成方面具有重要作用,过表达的 PDGFC 促进血管异常化,其表达在乳腺癌起始、发生及转移中发挥着显著作用^[5,6]。HuR 属于胚胎致死性

异常视觉(embryonic lethal abnormal vision, ELAV)基因家族成员,在细胞中,它们主要通过基因的转录后调节机制调节靶基因的表达;近年来研究表明, HuR 蛋白是免疫细胞激活、肌肉分化、细胞分裂衰老等生命活动的重要调节基因,在转移性乳腺癌中高度活化^[7,8]。本研究着眼于探讨乳腺癌细胞中 HuR 调控 PDGFC 的分子机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购买于美国培养物集存库,实验室保存。所有细胞采用 DMEM 培养基(含 10 %FBS、100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素),置于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81001181);陕西省自然科学基金项目(2016JM8066)

作者简介:罗年安(1982-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:普外科基础与临床研究, E-mail: 719176489@qq.com

Δ 通讯作者:董瑞, E-mail: 1924887592@qq.com

(收稿日期:2016-12-09 接受日期:2016-12-29)

孵箱内常规传代培养,细胞在培养瓶中呈贴壁生长。

1.2 方法

1.2.1 预测 PDGFC 3'UTR 的 HuR 结合位点 首先从 NCBI GenBank 数据库中检索人 PDGFC 基因 mRNA 的全部序列,并查找其中的 3'UTR 序列,然后通过软件预测 HuR 结合原件的位点。

1.2.2 RNA 免疫共沉淀(RNA-IP) MDA-MB-231 细胞中加入 PDGFC,室温孵育 48 h;用冰 1× PBS 洗涤细胞一次,刮下细胞,用 1 mL 预冷 IP buffer 裂解液裂解细胞,置于冰上 30 min;收集细胞裂解液,4 ℃,12000 r/min,离心 15 min 后,取上清作为对照(Input);剩余上清液分装两 EP 管中,各加 20 mL Salmon Sperm DNA 和 Protein A/G,冰上孵育 30 min,4 ℃,12000 r/min,离心 1 min;各加入 HuR 多克隆抗体和 IgG,4 ℃过夜;各加入 40 μL Salmon Sperm DNA 和 Protein A/G,冰上孵育 60 min,4 ℃,12000 r/min,离心 1 min;弃去上清,IP buffer 裂解液洗涤 3 次;Trizol 提取 RNA,反转录,实时定量 PCR 检测。

1.2.3 截短 PDGFC 3'UTR 和 si-HuR2 干预后,报告基因活性检测 本实验中构建 pGL3-PDGFC 3'UTR 全长及 5 个不同的 pGL3-PDGFC 3'UTR 截短体的质粒,与 si-HuR2 共转染细胞,报告基因系统检测 HuR 与目的基因 PDGFC 之间的作用位点。报告基因质粒转染选用 24 孔板接种细胞 MDA-MB-231,脂质体转染细胞,每孔总的转染质粒量为 0.4 μg,内参照 phRL10 ng,共分为三组,48 h 后收集样品,报告基因活性分析严格按照试剂盒推荐的方法进行。PDGFC 3'UTR 的全长及 5 个截短体分别命名为 PDGFC-1,PDGFC-2,PDGFC-3,PDGFC-4,PDGFC-5,PDGFC-6,PDGFC mRNA 3'UTR 全长及 5 个截短体 PCR 引物如下。

表 1 PDGFC 3'UTR 截短体 PCR 引物

Table 1 The PCR primer sequences of truncated PDGFC 3'UTR

Name	Sequence
shared upstream primer	5'-TTTCTAGACCGCATCAC-CACCAGCAGCTC-3'
downstream primer PDGFC-6	5'-TTTCTAGACCTGAAGAT-GAAAGGTCCTTG-3'
downstream primer PDGFC-5	5'-TTTCTAGAGGCAGAAATTT-TAATAAGAA-3'
downstream primer PDGFC-4	5'-TTTCTAGAACCTTTG-GTAAAAATAGATATA-3'
downstream primer PDGFC-3	5'-TTTCTAGAAGGATGTGTTT-CTACTGCACA-3'
downstream primer PDGFC-2	5'-TTTCTAGATGCCAGAGTA-CAATAAGTGAAC-3'
downstream primer PDGFC -1	5'-TTTCTAGATCCC-CAAAATAGCCACATTC-3'

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验统计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 预测 PDGFC 3'UTR 的 HuR 结合位点

结合文献并通过生物信息学分析,我们发现 PDGFC 的调控发生在转录后水平,且 PDGFC 可能受 RNA 结合蛋白 HuR 的调控。那么 PDGFC 3'UTR 是否存在 HuR 的结合位点呢?从 NCBI GenBank 数据库中检索人 PDGFC 基因 mRNA 的全部序列,并查找其中的 3'UTR 序列,通过软件预测分析发现,PDGFC 3'UTR 可能存在五个 HuR 结合位点(图 1)。

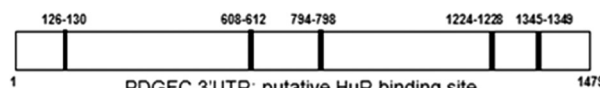


图 1 预测 PDGFC 3'UTR 的 HuR 结合位点

Fig. 1 Predicted HuR-binding sites in the 3'-UTR of PDGF-C

2.2 RNA-IP 证实 HuR 与 PDGFC mRNA 的直接相互作用

为了进一步证实乳腺癌细胞中 HuR 与 PDGFC mRNA 3'UTR 确实存在着相互作用,在 RNA 免疫共沉淀(RNA-IP)实验中,当加入 PDGFC 刺激后,HuR 与 PDGFC mRNA 出现共沉淀,从而验证了 HuR 和 PDGFC 之间的直接相互作用(图 2)。

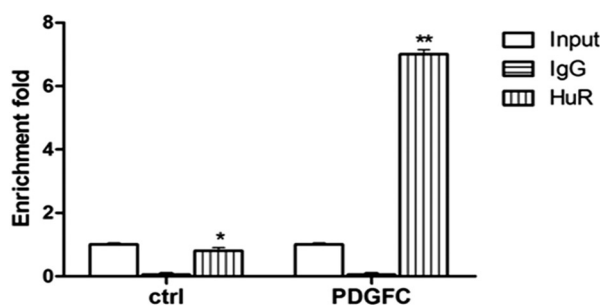


图 2 RNA-IP 证实 HuR 与 PDGFC mRNA 的直接相互作用

Fig. 2 RNA-immunoprecipitation confirmed the direct association of HuR with the PDGF-C mRNA

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group.

2.3 PDGFC mRNA 3'UTR 报告基因系统检测

生物信息学分析和软件预测表明,PDGFC mRNA 3'UTR 存在五个 HuR 的结合位点,为此,我们构建 PDGFC 3'UTR 五个截短体。PDGFC 3'UTR 的全长及 5 个截短体分别命名为 PDGFC-1、-2、-3、-4、-5、-6,通过报告基因实验检测哪些结合位点在 HuR 对 PDGFC 的调控中起着关键性作用。实验结果显示第 2 个和第 4 个位点可与 HuR 结合,调控 PDGFC 的表达;同时,我们检测了 si-HuR2 对 PDGFC mRNA 3'UTR 报告基因的影响,荧光素酶活性检测发现,si-HuR2 能显著降低 PDGFC 3'UTR 荧光素酶活性。因此,这部分实验证明了在 PDGFC mRNA 的 3'UTR 上,含有 HuR 的结合位点,介导 HuR 对 PDGFC 的调控(图 3)。

3 讨论

乳腺癌作为女性发病率排第一的恶性肿瘤,其发生发展的分子机制一直备受研究者的关注。与其他恶性肿瘤一样,乳腺癌的发生发展过程涉及多因素的参与,其中分子生物学指标已成为乳腺癌治疗研究的热点,越来越多的研究表明,不同分子表型的乳腺癌在治疗效果、疾病转归以及预后上存在明显差异^[9,10]。

其中受体三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 与人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,

HER2) 高表达型乳腺癌容易出现复发和转移, 患者预后相对较差。对此类乳腺癌除现有治疗外, 亟需探索新的分子靶点^[11,12]。

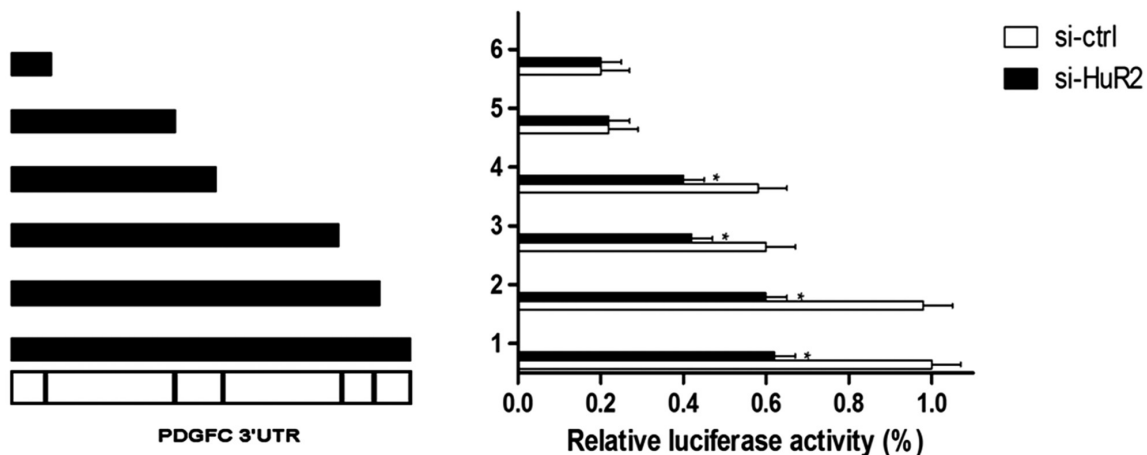


图 3 PDGFC mRNA 3'UTR 荧光素酶活性

Fig. 3 The luciferase activity of PDGFC mRNA 3'UTR

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group.

研究表明, PDGFC 在晚期乳腺癌组织和侵袭性细胞系中的表达明显增高, 并成为患者预后不良的独立因子, PDGFC 在促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭过程中发挥着重要的作用, 下调 PDGFC 的表达抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为, 故 PDGFC 可能会成为治疗乳腺癌的一个靶点, 对乳腺癌患者预后判断具有重要意义^[13,14]。为探讨乳腺癌中 PDGFC 表达异常的可能机制, 我们首先关注导致 PDGFC 表达异常的上游基因。根据国内外已发表的相关文献, HuR 是胚胎致死性异常视觉基因 (ELAV) 家族中最具代表性的 RNA 结合蛋白, 在乳腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌及结肠癌等恶性肿瘤中广泛表达, 与肿瘤的发生发展密切相关, HuR 通过与靶基因的 mRNA 结合转录后调控基因表达^[15,16]。正常情况下, HuR 主要定位于细胞核内, 通过 RNA 识别模体 (RRMs) 与靶基因 mRNA 3'UTR 的富含 AU 的元件 (AREs) 相结合, 但当受到细胞因子、低氧以及免疫治疗等刺激时从细胞核穿梭至细胞浆, 从而增加 mRNA 的稳定性, 增强靶基因的表达^[17,18]。

为探讨 HuR 调控 PDGFC 的可能机制, 在本实验中, 我们首先通过软件预测了 PDGFC 3'UTR 存在 HuR 的五个结合位点; 接着通过 RNA-IP 实验进一步明确了两者之间的直接相互作用; 最后通过报告基因实验和 siRNA 干扰实验证实 PDGFC 3'UTR 的两个 HuR 结合位点。本研究结果显示, HuR 通过与 PDGFC mRNA 的 3'UTR 结合转录后调控 PDGFC。文献报道, 成纤维细胞表达 PDGFR, PDGFC 是成纤维细胞聚集与活化的关键调节基因, 能够促进成纤维细胞的趋化和有丝分裂^[19,20]。结合上述实验结果, 高度提示 HuR 增强 PDGFC 表达可能是肿瘤细胞促进成纤维细胞增殖和活化的重要机制, 从而形成 "HuR-PDGFC-成纤维细胞活化" 通路, 分析该通路促进乳腺癌恶性演变和恶性微环境的形成, 丰富对肿瘤增殖和转移认识的同时, 为乳腺癌的治疗提供新策略。

总之, 本研究揭示了 HuR 通过与 PDGFC mRNA 的 3'UTR 结合转录后调控 PDGFC 的分子机制, 为寻找 PDGFC 的抑制剂提供新的思路, 为乳腺癌的临床诊断及治疗提供新的策略。

参考文献 (References)

- [1] Taylor-Phillips S, Wallis M G, Jenkinson D, et al. Effect of Using the Same vs Different Order for Second Readings of Screening Mammograms on Rates of Breast Cancer Detection: A Randomized Clinical Trial[J]. JAMA, 2016, 315(18): 1956-1965
- [2] Rafferty E A, Durand M A, Conant E F, et al. Breast Cancer Screening Using Tomosynthesis and Digital Mammography in Dense and Non-dense Breasts[J]. JAMA, 2016, 315(16): 1784-1786
- [3] Luo N A, Qu Y Q, Yang G D, et al. Post-transcriptional up-regulation of PDGF-C by HuR in advanced and stressed breast cancer [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20306-20320
- [4] Strnad V, Uter W, Polgar C. Partial breast irradiation and the GEC-ESTRO trial - Authors' reply[J]. Lancet, 2016, 387(10029): 1718-1719
- [5] Hurst N J, Najy A J, Ustach C V, et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression[J]. Biochem J, 2012, 441(3): 909-918
- [6] Frings O, Augsten M, Tobin N P, et al. Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling [J]. Am J Pathol, 2013, 182(6): 2037-2047
- [7] Guo X, Connick M C, Vanderhoof J, et al. MicroRNA-16 modulates HuR regulation of cyclin E1 in breast cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(4): 7112-7132
- [8] Latorre E, Carelli S, Raimondi I, et al. The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer [J]. Cancer Res, 2016, 76(9): 2626-2636
- [9] Jacob J A. More Women With Breast Cancer Opt for Bilateral Mastectomy Despite Lack of Survival Benefit [J]. JAMA, 2016, 315(20): 2154-2156
- [10] Matemavi P, Vuong P, Morgenstern N, et al. Metastatic Invasive Lobular Breast Cancer Presenting as Gastric Cancer [J]. J Am Coll Surg, 2016, 222(2): e10-e11
- [11] Owsley J, Jimeno A, Diamond J R. Palbociclib: CDK4/6 inhibition in the treatment of ER-positive breast cancer [J]. Drugs Today (Barc), 2016, 52(2): 119-129

(下转第 4846 页)

- [20] Sriuranpong V, Chantranuwat C, Huapai N, et al. High frequency of mutation of epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinoma in Thailand[J]. Cancer Lett, 2006, 239(2): 292-297
- [21] 陈慧娟,喻长顺,李洪波,等. 广东地区非小细胞肺癌 EGFR 基因的突变研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, (01): 29-32
Chen Hui-juan, Yu Chang-shun, Li Hong-bo, et al. EGFR gene mutation status among NSCLC patients in Guangdong province [J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2011, (01): 29-32
- [22] 王继灵,操乐杰,伍权,等. 安徽省非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因的突变[J]. 中国老年学杂志, 2012, (09): 1822-1824
Wang Ji-ling, Cao Le-jie, Wu Quan, et al. EGFR gene mutation status among NSCLC patients in Anhui province [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, (09): 1822-1824
- [23] 董丹丹,唐源,邹艳,等. 四川地区肺腺癌中 EGFR 基因 19、21 外显子突变研究[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, (12): 1306-1309
Dong Dan-dan, Tang Yuan, Zou Yan, et al. Study of exons 19 and 21 mutations of epidermal growth factor receptor gene in patients with lung adenocarcinoma of Sichuan Province [J]. J Clin Exp Pathol, 2011, (12): 1306-1309
- [24] Huang S F, Liu H P, Li L H, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8195-8203
- [25] 刘恺. 非小细胞肺癌 CT 灌注参数与 EGFR、MMP-9 的相关性研究[D]. 南方医科大学, 2013
Liu Kai. Correlation analysis between CT perfusion parameters and EGFR, MMP-9 in patients with non-small cell lung cancer [D]. Southern Medical University, 2013
- [26] 唐艳萍,张力图,谭晓玉,等. 广西南宁地区非小细胞肺癌 EGFR 基因突变分析[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(5): 1067-1070
Tang Yan-ping, Zhang Li-tu, Tan Xiao-yu, et al. Analysis of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in Nanning Guangxi China [J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(5): 1067-1070
- [27] 单莉,张琰,赵峰,等. 维吾尔族肺腺癌患者的 EGFR 基因突变分析[J]. 中国肺癌杂志, 2013, (02): 78-81
Shan Li, Zhang Yan, Zhao Feng, et al. EGFR Mutation Status in Uighur Lung Adenocarcinoma Patients [J]. Chin J Lung Cancer, 2013 (02): 78-81
- [28] Hu Y C, Zhang Q, Huang Y H, et al. Comparison of two methods to extract DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and their impact on EGFR mutation detection in non-small cell lung carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6): 2733-2737
- [29] Tan DS, Yom SS, Tsao MS, et al. The international association for the study of lung cancer consensus statement on optimizing management of egfr mutation-positive non-small cell lung cancer: Status in 2016[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(7): 946-963

(上接第 4830 页)

- [12] Bernstein M. Intraoperative radiation therapy for breast cancer: a patient's view[J]. Lancet, 2016, 387(10031): 1904-1905
- [13] Weigel M T, Ghazoui Z, Dunbier A, et al. Preclinical and clinical studies of estrogen deprivation support the PDGF/Abl pathway as a novel therapeutic target for overcoming endocrine resistance in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(3): R78
- [14] Devarajan E, Song Y H, Krishnappa S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer lines is mediated through PDGF-D released by tissue-resident stem cells[J]. Int J Cancer, 2012, 131(5): 1023-1031
- [15] Wang J, Li D, Wang B, et al. Predictive and prognostic significance of cytoplasmic expression of ELAV-like protein HuR in invasive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 141(2): 213-224
- [16] Latorre E, Castiglioni I, Gatto P, et al. Loss of protein kinase Cdelta/HuR interaction is necessary to doxorubicin resistance in breast cancer cell lines [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 349 (1): 99-106
- [17] Zhu Z, Wang B, Bi J, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with P-gp, HER-2 positivity, and poor outcome in breast cancer[J]. Tumour Biol, 2013, 34(4): 2299-2308
- [18] Li Y, Yu J, DU D, et al. Involvement of post-transcriptional regulation of FOXO1 by HuR in 5-FU-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Oncol Lett, 2013, 6(1): 156-160
- [19] Xu Y, Liu J, He M, et al. Mechanisms of PDGF siRNA-mediated inhibition of bone cancer pain in the spinal cord [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27512
- [20] Zeng Q, Wei B, Zhao Y, et al. Shh mediates PDGF-induced contractile-to-synthetic phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells through regulation of KLF4[J]. Exp Cell Res, 2016