

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.007

· 基础研究 ·

## Med19 基因沉默对 p53 野生型和突变型乳腺癌细胞紫杉醇化疗疗效的影响

杨晓丹<sup>1</sup>, 郭子健<sup>1</sup>, 刘贝贝<sup>2</sup>, 李莉华<sup>2</sup> (1. 无锡市第四人民医院暨江南大学附属医院 肿瘤外科, 江苏 无锡 214062; 2. 无锡市第四人民医院暨江南大学附属医院 肿瘤研究所, 江苏 无锡 214062)

**[摘要]** **目的:** 探讨下调中介体(mediator, Med)19 表达是否增加紫杉醇(paclitaxel, PTX)对 p53 野生型和突变型乳腺癌细胞化疗的疗效。**方法:** 构建 Med19 RNA 干扰(RNAi)慢病毒, 分别感染 p53 野生型的乳腺癌细胞 MCF-7 和 p53 突变型的乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 两种细胞均分为 Med19 基因敲减组(KD 组: 细胞感染 pGscil-Med19-siRNA-GFP)、空载体感染组(NC 组: 细胞感染 pGscil-Med19-NC-GFP)、对照组(CON 组: 未感染慢病毒的乳腺癌细胞), 荧光显微镜观察慢病毒感染效率。Western blotting 检测 Med19 基因沉默后各组细胞内 P53、磷酸化 P53(pP53)、P21 蛋白表达水平的变化。紫杉醇分别作用于 Med19 基因沉默前后的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞, MTT 法检测细胞增殖抑制率的变化, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡率的变化。**结果:** KD 组和 NC 组细胞的荧光感染效率均大于 90%, 表明获得了满意的感染效率。与 CON 组和 NC 组相比, 两种细胞 KD 组的 Med19 蛋白表达水平均下降, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。MCF-7 细胞 KD 组 P53、pP53、P21 蛋白表达上调, 差异有统计意义(均  $P < 0.05$ )。在 0.01 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  范围内, 紫杉醇抑制两种乳腺癌细胞的生长增殖并呈浓度依赖性( $P < 0.05$ ), 对 KD 组的抑制率和细胞凋亡率均高于 NC 组及 CON 组, 差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 但 MDA-MB-231 细胞各组间抑制率差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。10  $\mu\text{g/ml}$  紫杉醇导致两种细胞的 KD 组和 NC 组均出现 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 并且 MCF-7 细胞 KD 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞较 NC 组显著增加( $P < 0.05$ )。**结论:** Med19 基因沉默增强紫杉醇对 p53 野生型乳腺癌 MCF-7 细胞化疗的疗效, 其机制可能为增强了 p53 基因的表达活化, 通过其下游基因 p21 调节细胞周期、促进细胞凋亡。

**[关键词]** Med19; P53; 乳腺癌; 紫杉醇; 药物敏感性

**[中图分类号]** R737.9; R730.54; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)06-0716-08

## The influence of silencing Med19 on the therapeutic effect of paclitaxel in human breast cancer cells with wild-type or mutated p53

Yang Xiaodan<sup>1</sup>, Guo Zijian<sup>1</sup>, Liu Beibei<sup>2</sup>, Li Lihua<sup>2</sup> (1. Department of Oncological Surgery, the Fourth People's Hospital and the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, Jiangsu, China; 2. Institute of Oncology, the Fourth People's Hospital and the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214062, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of downregulating Med19 (mediator 19) expression on the therapeutic effect of paclitaxel in breast cancer cells with wild type or mutated p53. **Methods:** Lentiviruses encoding small RNA that interferes Med19 expression were generated to infect cells of breast cancer cell lines MCF-7 (p53 wild type) and MDA-MB-231 (p53 mutation type). They were divided into Med19 knock-down groups (KD group, infected with pGscil-Med19-siRNA-GFP), empty vector groups (NC group, infected with pGscil-Med19-NC-GFP), and control groups (CON group, non-infected). GFP expression visualized under fluorescence microscope was used as an indicator of the efficiency of lentiviral infection. After silencing of Med19 the levels of P53, phosphorylated P53 and P21 in cells of the different groups were determined by immunoblotting. The proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells under various experimental conditions was measured by the MTT assay. Flow cytometry was used to examine cell cycle and apoptosis. **Results:** Judged by fluorescent protein expression, more than 90% of MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells infected with

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目资助(No. 81472485);江苏省“六大人才高峰”项目资助(No. WSW-014);无锡市医院管理中心项目资助(No. YGZXQ1311)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81472485), the Project of “Six Major Talent Summit” of Jiangsu Province (No. WSW-014), and the Project of Hospital Management Center of Wuxi City (No. YGZXQ1311)

**[作者简介]** 杨晓丹(1987-),男,山东省德州市人,医学硕士,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究, E-mail: sudayangxiaodan@163.com

**[通信作者]** 李莉华(Li Lihua, corresponding author), E-mail: LLHWXS@aliyun.com

the lentiviruses in both KD and NC groups. The levels of *Med19* expression in MCF-7 and MDA-MB-231 cells of the KD group were significantly lower than those in both CON and NC groups ( $P < 0.05$ ). The expressions of P53, phosphorylated P53, and P21 were significantly upregulated in MCF-7 cells of the KD group ( $P < 0.05$ ). In the 0.01 – 50  $\mu\text{g/ml}$  range, paclitaxel induced a dose-dependent growth inhibition of both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. For MCF-7 cells, the degree of inhibition and the number of apoptotic cells in KD group were significantly higher than those in the both NC and CON groups ( $P < 0.05$ ). However, they were not significantly different between the three groups of MDA-MB-231 cells ( $P > 0.05$ ). While both MCF-7 and MDA-MB-231 cells underwent  $G_2/M$  cell cycle block when treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of paclitaxel, cycle of  $G_0/G_1$  phase in KD group of MCF-7 cells more significantly increased than that in their NC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The therapeutic effect of paclitaxel on MCF-7 cells (*p53* wild type) is enhanced by silencing *Med19*, which is likely mediated by the activation of *p53* and expression of its downstream genes including *p21* gene, leading to cell cycle block and apoptosis.

[ **Key words** ] mediator19; P53; breast cancer; paclitaxel; drug-sensitivity

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 716-723 ]

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 对多种实体肿瘤疗效显著, 并已成为乳腺癌化疗的一线用药和新辅助化疗用药<sup>[1]</sup>, 但肿瘤易对其产生耐药性, 这在一定程度上限制了其在临床上的应用。中介体 (mediator, Med) 是 RNA 聚合酶 II 通用转录装置的重要组成部分, *Med19* 是 Med 的一个蛋白组分。笔者课题组前期研究<sup>[2-5]</sup>发现, *Med19* 在乳腺癌中高表达, 并与肿瘤的低分化相关; 抑制 *Med19* 在乳腺癌细胞中的表达, 可抑制细胞的生长、增殖和侵袭、迁移。课题组在预实验中发现, 在人乳腺癌 MCF-7 细胞中沉默 *Med19* 基因后, 磷酸化的 P53 (pP53) 表达升高。由于抑癌基因 *p53* 与紫杉类药物耐药密切相关<sup>[6-8]</sup>, 因此, 本研究以 *p53* 野生型的 MCF-7 细胞及 *p53* 突变型的 MDA-MB-231 细胞为研究对象, 利用 *Med19* RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 慢病毒载体转染两种乳腺癌细胞, 观察沉默 *Med19* 对不同 *p53* 背景的乳腺癌细胞 PTX 化疗疗效的影响, 并分析其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

DMEM、改良型 RPMI 1640 培养基购自赛默飞世尔公司, 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 兔抗人 *Med19* 一抗购自 Abcam 公司, 羊抗兔 *Med19* 二抗、鼠抗人 P53、pP53、P21 一抗及鼠抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、细胞周期试剂盒、Annexin V/PI 双染凋亡试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司; PTX 注射液购自扬子江药业集团有限公司 (批号: 13031511; 规格: 30 mg/5 ml)。人乳腺癌 MCF-7 细胞 (*p53* 野生型)、MDA-MB-231 细胞 (*p53* 突变型) 由本所保存。 *Med19*

RNAi 慢病毒载体由上海吉凯基因公司构建。

### 1.2 细胞培养及慢病毒感染

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液、改良型 RPMI 1640 培养液于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中进行培养。两种细胞均分为 *Med19* 基因敲减组 (KD 组: 细胞感染 pGscil-*Med19*-siRNA-GFP)、空载体感染组 (NC 组: 细胞感染 pGscil-*Med19*-NC-GFP)、对照组 (CON 组: 未感染慢病毒的乳腺癌细胞)。感染 72 h 后, 荧光显微镜观察细胞荧光表达。荧光显微镜检测到的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达阳性率为感染率。感染率 (%) = (荧光阳性细胞数 / 总细胞数)  $\times 100\%$ , 并采用 Western blotting 检测感染后细胞内 *Med19* 蛋白的表达, 鉴定沉默效果。感染效率达 80% 时扩大培养用于细胞实验。

### 1.3 Western blotting 检测慢病毒感染对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞内 *Med19* 表达的影响

各组细胞培养 72 h, 抽提蛋白, 经 SDS-PAGE, 将蛋白半干转膜, 用 PBST 封闭 1 h, 再加入兔抗人 *Med19* 一抗 (1:1 500) 杂交, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBST 洗涤 3 次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 *Med19* 二抗 (1:1 500) 杂交 2 h, PBST 洗涤, Bio-Rad 凝胶成像仪显影, Quantity One 软件扫描分析条带灰度, 以目的蛋白与  $\beta$ -actin 的灰度比值作为其相对表达量。

### 1.4 MTT 法检测慢病毒感染与 PTX 对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞增殖的影响

取对数生长期的上述 3 组细胞, 约每孔  $4 \times 10^3$  个接种于 96 孔培养板中, 并设空白对照组 (只有培养液, 无细胞), 各组设 3 个复孔。分别在第 1~5 天弃去培养液, 每孔加入 MTT 继续培养 4 h, 加入 DMSO 摇床震荡 15 min, 酶标仪测各孔 490 nm 光密

度( $D$ )值。上述 3 组细胞接种、培养过夜后,加入不同浓度(0.01、0.1、1.0、10、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 PTX,并设空白对照组,余步骤同上。增殖抑制率(%) =  $1 - (\text{各组药物组 } D \text{ 值} - \text{空白对照组 } D \text{ 值}) / (\text{各组不加药物 } D \text{ 值} - \text{空白对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

### 1.5 流式细胞术检测慢病毒感染与 PTX 对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞周期的影响

取对数生长期的上述 3 组细胞以  $1 \times 10^6$ /瓶接种于培养瓶内,并增设 PTX + NC 组和 PTX + KD 组(即细胞贴壁后,分别在 NC 组和 KD 组各加入 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PTX 的培养液),48 h 后收集细胞,制备细胞悬液,447.2  $\times g$  离心 5 min,弃上清,用 1 ml 在  $-20^\circ\text{C}$  预冷的 70% 乙醇固定过夜,447.2  $\times g$  离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤,加入 100  $\mu\text{l}$  RNaseA,37  $^\circ\text{C}$  水浴 30 min,加入 400  $\mu\text{l}$  PI,混匀,置于 4  $^\circ\text{C}$  下避光染色 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。

### 1.6 流式细胞术检测慢病毒感染与 PTX 对 MCF-

### 7、MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

取对数生长期的上述 5 组细胞以  $1 \times 10^6$ /瓶接种于培养瓶内,分别培养 48 h 后收集细胞,制备细胞悬液,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 混匀,加入 5  $\mu\text{l}$  Propidium Iodide 混匀,避光室温反应 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组重复 3 个样本。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数的比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,用 Graphpad Prism 5.0 软件拟合图形。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒感染成功沉默 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞内 Med19 的表达

慢病毒感染 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞 72 h 后,荧光显微镜检测显示,KD 组和 NC 组细胞的荧光感染效率均大于 90%,表明获得了良好的感染效率。见图 1。

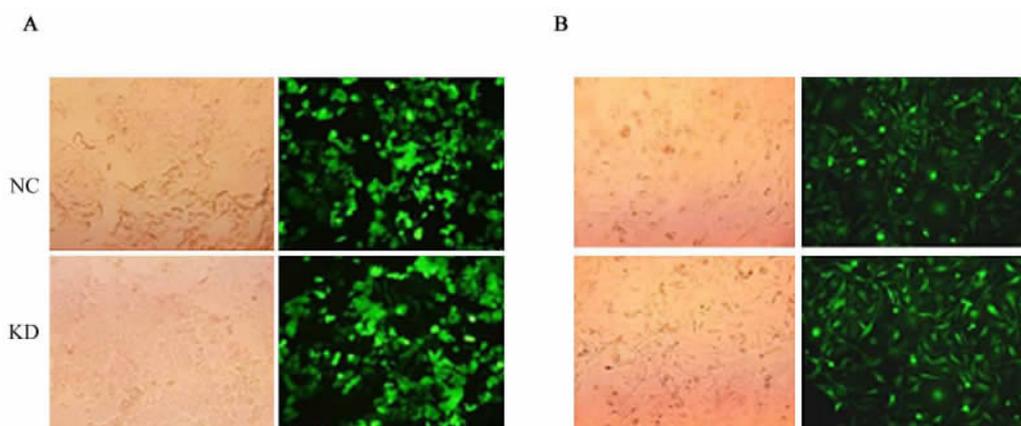


图 1 慢病毒感染效率的检测(  $\times 200$  )

Fig. 1 Detection of lentiviral infection efficiency(  $\times 200$  )

A: MCF-7 cells; B: MDA-MB-231 cells; Left column: The phase contrast; Right column: GFP expression

慢病毒感染 72 h 后,Western blotting 检测(图 2)显示,与 NC 组及 CON 组相比,MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞 KD 组 Med19 蛋白表达水平下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),NC 组与 CON 组细胞的 Med19 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 Med19 沉默促进乳腺癌细胞 P53、pP53、P21 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 3、4)显示,P53、pP53、P21 蛋白在 MCF-7 细胞 KD 组表达较 NC 组

和 CON 组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),NC 组与 CON 组间蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );P53、pP53、P21 蛋白表达在 MDA-MB-231 细胞 3 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 Med19 基因沉默抑制乳腺癌细胞的增殖

MTT 检测结果(图 5)显示,慢病毒感染两种乳腺癌细胞后,与 NC 组及 CON 组细胞相比,KD 组细胞增殖受到抑制,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),呈时间依赖性。

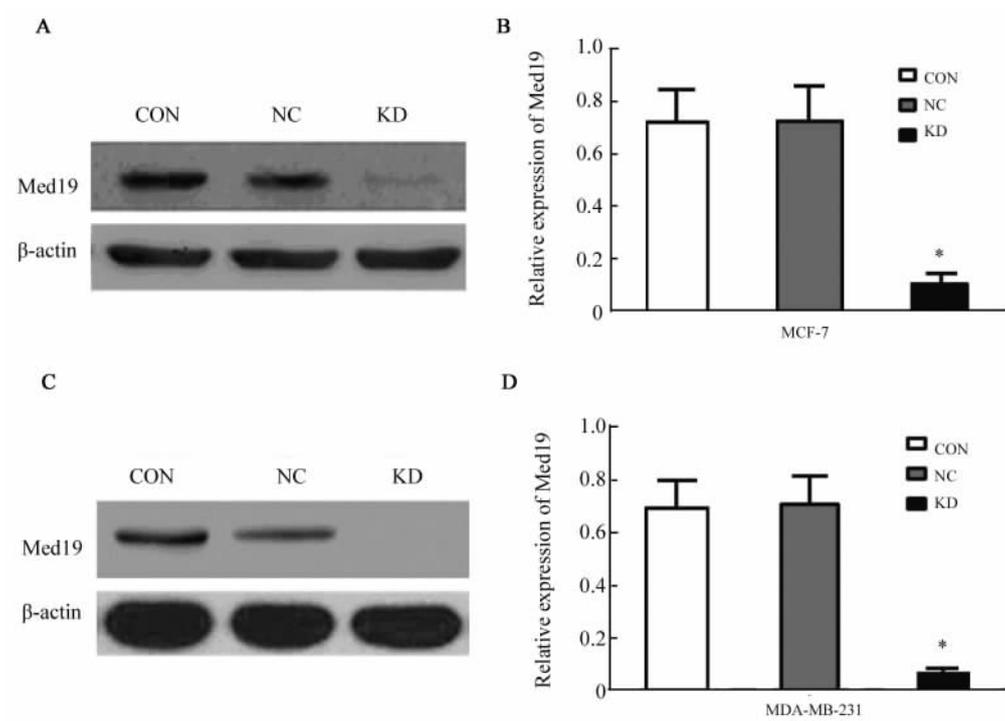


图 2 沉默 *Med19* 对乳腺癌细胞内 *Med19* 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of silencing *Med19* on expression of *Med19* protein in breast cancer cells

A, B: MCF-7 cells; C, D: MDA-MB-231 cells; \*  $P < 0.05$  vs CON or NC group

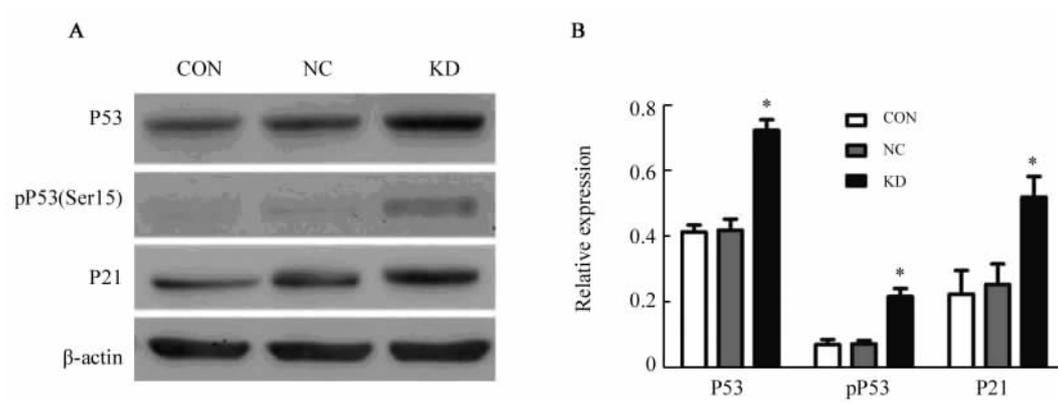


图 3 沉默 *Med19* 对 MCF-7 细胞内 *P53*、*pP53*、*P21* 表达的影响

Fig. 3 Effects of silencing *Med19* on expression of *P53*, *pP53* and *P21* protein MCF-7 cells

\*  $P < 0.05$  vs CON or NC group

## 2.4 PTX 对 *Med19* 沉默前后乳腺癌细胞的影响

2.4.1 细胞增殖 MTT 检测结果(图 6)显示,不同浓度的 PTX 作用于 MCF-7、MDA-MB-231 细胞的 CON、NC、KD 组 48 h 后,各组细胞的生长均受到抑制 ( $P < 0.05$ ),并呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。在 PTX 浓度为 0.1 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  时, KD 组抑制率较 CON、NC 组增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的 PTX 对 MDA-MB-231

细胞 KD 组的抑制率虽然高于 CON 及 NC 组,但相同浓度各组之间比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4.2 细胞周期 流式细胞术检测结果显示,与 NC 组及 CON 组细胞相比,两种乳腺癌细胞细胞 KD 组均出现出现  $G_0/G_1$  期阻滞 ( $P < 0.05$ )。

PTX + NC 组和 PTX + KD 组均将细胞阻滞于  $G_2/M$  期。MCF-7 细胞 PTX + KD 组  $G_2/M$  期细

胞所占的比例与 PTX + NC 组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 但  $G_0/G_1$  期细胞比例较 PTX + NC 组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 MDA-

MB-231 细胞 PTX + KD 组  $G_0/G_1$  期细胞比例较 PTX + NC 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

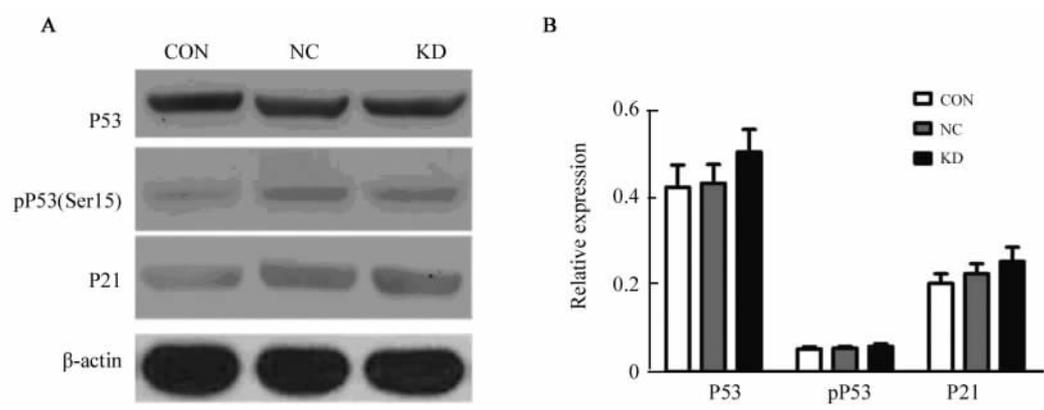


图 4 沉默 Med19 对 MDA-MB-231 细胞内 P53、pP53、P21 表达的影响

Fig. 4 Effects of silencing Med19 on expression of P53, pP53 and P21 proteins in MDA-MB-231 cells

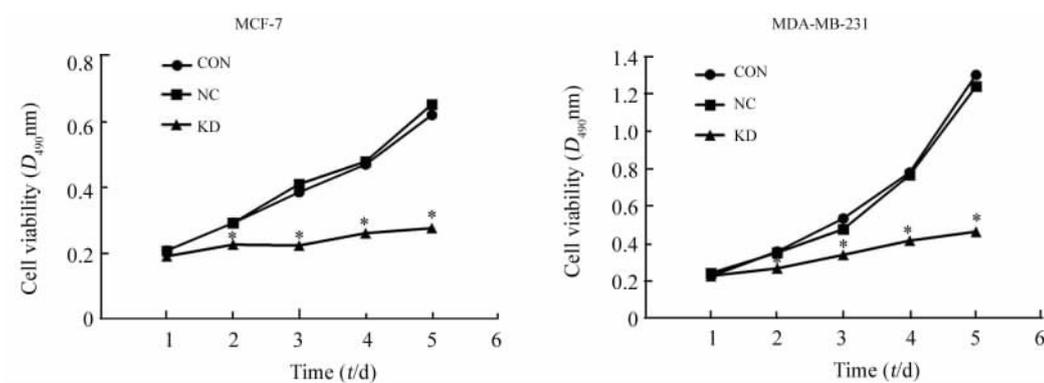


图 5 Med19 基因沉默对两种乳腺癌细胞增殖的影响

Fig. 5 Effects of silencing Med19 on proliferation of breast cancer cells

\*  $P < 0.05$  vs NC or CON group

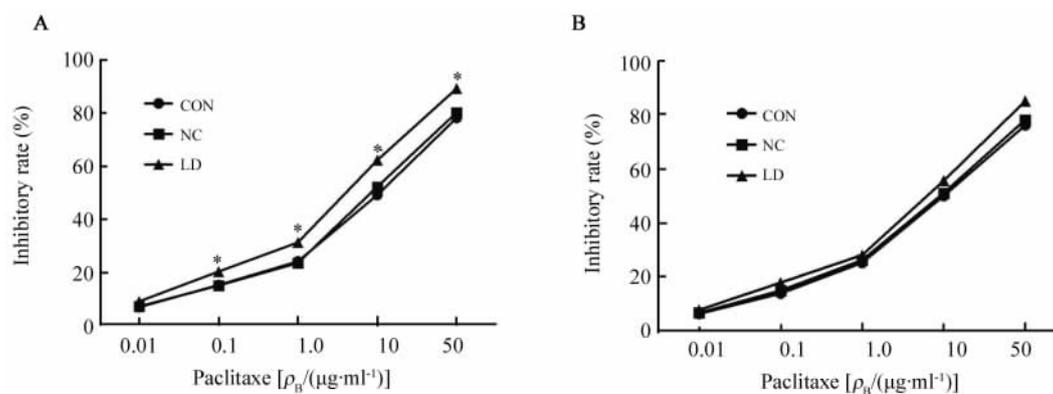


图 6 不同浓度 PTX 对各组 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effects of PTX at different concentrations on proliferation of MCF-7 or MDA-MB-231 cells in each group

A: MCF-7 cells ; B: MDA-MB-231 cells. \*  $P < 0.05$  vs CON or NC group

表 1 PTX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 对 *Med19* 基因沉默前后 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.1 Effects of PTX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) on cell circle of MCF-7 or MDA-MB-231 cells before and after silencing *Med19*( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Cell	Group	Cell cycle distribution		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
MCF-7	CON	61.32 $\pm$ 3.13	25.37 $\pm$ 2.45	13.43 $\pm$ 5.4
	NC	62.14 $\pm$ 4.70	25.44 $\pm$ 2.23	13.07 $\pm$ 2.29
	KD	71.14 $\pm$ 5.70*	24.34 $\pm$ 2.31	4.47 $\pm$ 1.29*
	PTX + NC	5.52 $\pm$ 0.78 $\Delta$	22.15 $\pm$ 1.69	72.37 $\pm$ 1.20 $\Delta$
	PTX + KD	10.12 $\pm$ 0.95 $\Delta$ $\blacktriangle$	19.86 $\pm$ 0.78	70.14 $\pm$ 1.22 $\Delta$
MDA-MB-231	CON	60.17 $\pm$ 3.43	26.28 $\pm$ 2.14	13.38 $\pm$ 5.42
	NC	63.20 $\pm$ 2.23	25.30 $\pm$ 2.57	10.87 $\pm$ 4.31
	KD	74.34 $\pm$ 6.21*	22.28 $\pm$ 2.21	3.52 $\pm$ 1.29*
	PTX + NC	6.18 $\pm$ 0.98 $\Delta$	24.26 $\pm$ 2.03	69.67 $\pm$ 1.20 $\Delta$
	PTX + KD	7.84 $\pm$ 0.93 $\Delta$	19.78 $\pm$ 0.78	72.33 $\pm$ 1.22 $\Delta$

\*  $P < 0.05$  vs CON or NC group;  $\Delta P < 0.05$  vs CON, NC or KD group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs PTX + NC group

2.4.3 细胞凋亡 流式细胞术检测结果(图7)显示, MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 KD 组的细胞凋亡率[(9.75  $\pm$  3.09)%、(8.65  $\pm$  2.19)%]均显著高于 NC 组[(4.42  $\pm$  1.27)%、(4.02  $\pm$  1.58)%]及 CON 组[(3.49  $\pm$  2.18)%、(2.09  $\pm$  1.28)%]( $P < 0.05$ )。

MCF-7 细胞中 PTX + KD 组的细胞凋亡率显著高于 PTX + NC 组[(59.77  $\pm$  2.31)% vs (36.42  $\pm$  4.27)% ,  $P < 0.05$ ]。MDA-MB-231 细胞中 PTX + KD 组与 PTX + NC 组的凋亡率无差异[(40.07  $\pm$  2.21)% vs (35.42  $\pm$  4.16)% ,  $P > 0.05$ ]。

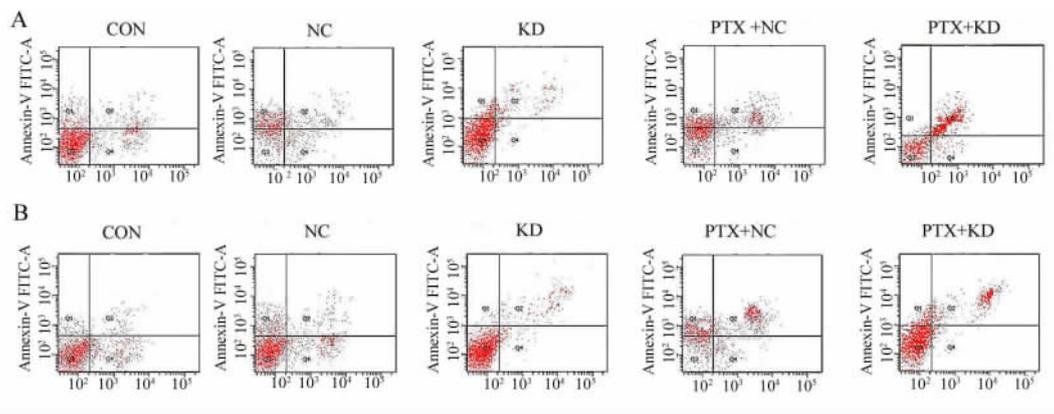


图 7 PTX 对 *Med19* 沉默前后 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effects of PTX on apoptosis of MCF-7 or MDA-MB-231 cells before and after silencing *Med19*

A: MCF-7 cells ; B: MDA-MB-231 cells

### 3 讨论

本课题组前期研究发现, *Med19* 基因在乳腺癌中高表达并促进肿瘤生长、转移。本研究也再次证实, 沉默 *Med19* 显著抑制两种乳腺癌细胞的生长、增殖。PTX 的抗肿瘤机制在于稳定微管, 从而抑制

细胞的分裂和增殖, 诱导细胞凋亡<sup>[9-11]</sup>。但其耐药性也亟待解决。为了探讨 *Med19* 基因表达水平对乳腺癌细胞 PTX 化疗疗效的影响, 用不同浓度的 PTX 分别作用于 CON 组、NC 组、KD 组细胞, 并选择各组不加药物的细胞为对照组计算抑制率, 以消除沉默基因对细胞增殖的影响, 发现在 *p53* 野生型的

MCF-7 细胞中, PTX 对 KD 组细胞的抑制作用显著大于 NC 组及 CON 组; 而对于 *p53* 突变型的 MDA-MB-231 细胞, 三组细胞抑制率的差异无统计学意义。表明沉默 *Med19* 可增强 *p53* 野生型的 MCF-7 细胞对 PTX 化疗的敏感性。

紫杉类药物的耐药性与 *p53* 基因的关系争论不断, 有学者认为此类药物不需要通过 *p53* 途径达到治疗作用。然而, Giannakakou 等<sup>[12]</sup>发现, 微管蛋白突变常伴有 *p53* 突变, *p53* 突变或功能丧失是紫杉类药物耐药的一个重要原因<sup>[13]</sup>。Wu 等<sup>[8]</sup>也报道 P53 通过诱导凋亡、抑制自噬而抑制结肠癌干细胞对 PTX 耐药。本研究发现, *p53* 野生型的 MCF-7 细胞沉默 *Med19* 基因后, 引起 P53Ser15 磷酸化, pP53、P53 和 P21 蛋白的表达显著升高, 而 *p53* 突变型的 MDA-MB-231 细胞未出现上述结果。Hata 等<sup>[14]</sup>报道, 野生型 *p53* 与突变型 *p53* 在肿瘤细胞中对 P21 蛋白表达的影响不同, 从而对增殖与凋亡的作用不同, 突变型 *p53* 不能使 P21 蛋白表达上调。本研究结果结合上述研究表明, 沉默 *Med19* 选择性地增强 *p53* 野生型的 MCF-7 细胞 PTX 化疗的疗效, 其机制可能是通过激活 P53/P21 途径促进细胞凋亡。

本研究显示, *Med19* 基因沉默促进两种乳腺癌细胞凋亡, 但 PTX 作用于 MCF-7 细胞 48 h 后, PTX + KD 组凋亡率较 PTX + NC 组凋亡率显著增加, 而 PTX 作用于 MDA-MB-231 细胞后, PTX + KD 组较 PTX + NC 组凋亡率差异无显著性。Barboule 等<sup>[15]</sup>发现, *p21* 作为一种促凋亡的上游基因参与了 PTX 引起的乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡过程。Geng 等<sup>[16]</sup>发现, P21 蛋白表达增加, 促进与 PTX 作用机制一致的抗肿瘤药物多西 PTX 对癌细胞的生长抑制和促凋亡作用。结合本研究 Western blotting 结果推测, *Med19* 基因沉默导致的 MCF-7 细胞凋亡的机制包括 P53-P21 依赖性和 P53-P21 非依赖性途径; *Med19* 基因沉默导致的 MDA-MB-231 细胞凋亡是 P53-P21 非依赖性的; 而 *Med19* 基因沉默对乳腺癌细胞 PTX 化疗的增敏作用可能是 P53/P21 依赖性的。

野生型 *p53* 基因编码的蛋白作为细胞周期转录调节因子可调节下游靶基因 *p21* 转录, 激活  $G_1/S$  检验点, 使基因受损的细胞停滞在  $G_1$  期, 并在修复失败后启动凋亡程序; 突变型 *p53* 基因则丧失了此功能而导致耐药。PTX 的作用是将细胞阻滞于  $G_2/M$  期, 从而使细胞停滞生长。本实验结果显示 *Med19* 基因沉默, 导致两种乳腺癌细胞出现  $G_0/G_1$  期阻滞。PTX 作用于 MCF-7 细胞 48 h 后, PTX + KD 组除出现  $G_2/M$  期阻滞外,  $G_0/G_1$  期细胞较 PTX + NC

组显著增高, 提示 *Med19* 基因沉默可通过 P53/P21 通路调节细胞周期, 增强 PTX 对 MCF-7 细胞的抑制和杀伤作用。而 *p53* 突变型的 MDA-MB-231 细胞, 在沉默 *Med19* 基因后未能提高 PTX 对癌细胞的化疗疗效, 分析其原因可能类似上述细胞凋亡现象。

总之, *p53* 野生型的 MCF-7 细胞在沉默 *Med19* 基因后能显著提高 *p53* 基因的表达和活化, 并通过上调 P21 蛋白的表达, 提高 PTX 对 MCF-7 细胞化疗的疗效。虽然在大多数肿瘤中 *p53* 基因都处于突变状态, 然而在乳腺癌中仅大约 20% 的病例表达有突变<sup>[12]</sup>。因此, 本课题组认为, *Med19* 和 *p53* 基因表达的检测有助于临床化疗方案的选择, 抑制 *Med19* 基因的表达可能是提高 PTX 化疗疗效的一个新思路, 可使大多数乳腺癌患者获益。

## [参 考 文 献]

- [1] Nechushtan H, Vainer G, Stainberg H, et al. A phase 1/2 of a combination of cetuximab and taxane for "triple negative" breast cancer patients [J]. *Breast*, 2014, 23(4): 435-438.
- [2] Li LH, He J, Hua D, et al. Lentivirus-mediated inhibition of *Med19* suppresses growth of breast cancer cells in vitro [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2011, 68(1): 207-215.
- [3] 戴桂萍, 李莉华, 郭子健, 等. *Med19* 在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系 [J]. *江苏医药*, 2013, 39(1): 39-42.
- [4] 王晓艳, 华东, 李莉华, 等. 沉默 *Med19* 对人乳腺癌裸鼠成瘤的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(17): 3109-3112.
- [5] 王晓艳, 郭子健, 吴小红, 等. 沉默中介体 19 对人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭及迁移的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(9): 1373-1375.
- [6] Liu Q, Sui R, Li R, et al. Biological characteristics of Taxol-resistant ovarian cancer cells and reversal of Taxol resistance by adenovirus expressing p53 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 1292-1297.
- [7] Li G, Zhao J, Peng X, et al. Radiation/paclitaxel treatment of p53-abnormal non-small cell lung cancer xenograft tumor and associated mechanism [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(4): 227-233.
- [8] Wu S, Wang X, Chen J, et al. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(4): 898-903.
- [9] Kelling J, Sullivan K, Wilson L, et al. Suppression of centromere dynamics by Taxol in living osteosarcoma cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2794-2801.
- [10] Thomas GE, Sreeja JS, Gireesh KK, et al. TIP EB1 downregulates paclitaxel-induced proliferation inhibition and apoptosis in breast cancer cells through inhibition of paclitaxel binding on microtubules [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 133-146.
- [11] 罗光华, 郭莉莉, 刘丽华. 紫杉醇与肿瘤免疫的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(2): 251-254.

- [ 12 ] Giannakou P, Poy G, Zhan Z, et al. Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null *p53* in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer [ J ]. *Oncogene*, 2000, 19( 27 ): 3078-3085.
- [ 13 ] Seagle BL, Yang CP, Eng KH, et al. TP53 hot spot mutations in ovarian cancer: selective resistance to microtubule stabilizers in vitro and differential survival outcomes from the cancer genome atlas [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2015, 138( 1 ): 159-164.
- [ 14 ] Hata T, Yamamoto H, Ngan CY, et al. Role of *p21 waf1/cip1* in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells [ J ]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4( 10 ): 1585-1594.
- [ 15 ] Barboule NC, Hadebech P, Baldin V, et al. A Involvement of *p21* in mitotic exit after paclitaxel treatment in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line [ J ]. *Oncogene*, 1997, 15( 23 ): 2867-2875.
- [ 16 ] Geng CX, Zeng ZC, Zhou CH, et al. Antitumor and radiosensitizing effect of docetaxel on human hepatocellular carcinoma and its mechanism in vivo [ J ]. *World Chin J Digestol*, 2005, 13( 24 ): 2848-2852.
- [ 17 ] Barroso-Gonzalez J, Thomas G. Endosome traffic machinery meets the *p53-p21* axis [ J ]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2( 2 ): e975075.
- [ 18 ] Zhu Y, Lei Y, Du B, et al. INMAP overexpression inhibits cell proliferation, induces genomic instability and functions through *p53/p21* pathways [ J ]. *PLoS ONE*, 2015, 10( 1 ): e0115704.
- [ 19 ] Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the *p53* gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis [ J ]. *Br J Cancer*, 1999, 80( 12 ): 1968-1973.

[ 收稿日期 ] 2015 - 05 - 28

[ 修回日期 ] 2015 - 09 - 29

[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 科技动态 ·

## RNA 结合蛋白 HuR 在 B 细胞体液免疫应答中发挥关键作用

B 淋巴细胞简称 B 细胞,是来源于骨髓的多能干细胞,其受抗原刺激后会增殖分化出大量浆细胞。在血液中循环浆细胞可合成和分泌抗体。成熟的 B 细胞经外周血迁出,进入脾脏、淋巴结,主要分布于脾小结、脾索及淋巴小结、淋巴索及消化道黏膜下的淋巴小结中,受抗原刺激后,分化增殖为浆细胞,合成抗体,发挥体液免疫的功能。B 细胞的细胞膜上有许多不同的标志,主要是表面抗原及表面受体。这些表面标志都是结合在细胞膜上的巨蛋白分子,B1 细胞为 T 细胞非依赖性细胞、B2 为 T 细胞依赖性细胞。B 细胞在体内存活的时间较短,仅数天至数周,但其记忆细胞在体内可长期存在。

哺乳类动物 B 细胞的分化过程主要可分为前 B 细胞、不成熟 B 细胞、成熟 B 细胞、活化 B 细胞和浆细胞五个阶段。其中前 B 细胞和不成熟 B 细胞的分化是抗原非依赖性的,其分化过程在骨髓中进行。抗原依赖阶段是指成熟 B 细胞在抗原刺激后活化继续分化为合成和分泌抗体的浆细胞,这个阶段的分化主要是在外周免疫器官中进行的。

HuR 蛋白是 mRNA 结合蛋白之一,可与多种肿瘤调控因子的 mRNA 相连接,调节其稳定性和翻译过程。*HuR* 基因,又称类胚胎致死性异常视觉基因(*ELAVL1*),最初在果蝇体内发现其同源基因。HuR 蛋白是一种 mRNA 结合蛋白,可以与多种调控因子如 *COX-2*、*VHL*、*VEGF*、*ICFIR*、*p53* 和 *Cyclin A* 等 mRNA 相连接,通过 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 等信号途径参与各种细胞应答及炎症、肿瘤形成等,但是近来发现,HuR 蛋白与 B 细胞体液免疫应答反应正常发挥之间存在联系。

墨尔本 Walter and Eliza Hall 医学研究所的 Kirsten Fairfax 博士,与英国 Babraham 研究所的 Manuel Diaz-Muñoz 博士、Martin Turner 博士及其同事们共同合作发现,去除 HuR 会阻碍 B 细胞正常功能的发挥。正常的免疫系统依赖免疫细胞中一个关键的“能源生产”蛋白,对疫苗和疾病产生免疫力,这个蛋白称为 HuR(人抗原 R),是控制 B 细胞代谢的关键。HuR“管理”一组基因,这组基因可确定 B 细胞产生多少能量、维持 B 细胞产生对抗感染和接种后形成长期免疫力至关重要的抗体。没有 HuR 的指导,这些关键的代谢酶基因就不再能指导 B 细胞生产所需的能量,B 细胞就无法成长为抗体分泌细胞。在 B 细胞最后成熟阶段需要的大量能量,来自于一个称为生发中心的“B 细胞工厂”。生发中心是 B 细胞的质量控制检查点。通过测试的 B 细胞成熟并转化为抗体分泌细胞,而那些无法通过质量控制的细胞再次开始成熟过程。如果免疫细胞的代谢不能正常发挥功能,生发中心的成熟就会停止,血浆 B 细胞不能发育成熟。这对于免疫系统具有潜在的灾难性,因为血浆 B 细胞可保护人体免受感染,并在免疫接种后为未来的感染做好准备。

了解控制 B 细胞发育和代谢的过程,可以帮助科学家找到提高疫苗的有效性或保持身体产生免疫力的方法。例如,一些抗癌药物可以影响细胞的新陈代谢,如果这些药物也影响 B 细胞的代谢,就可能危及患者产生防止感染所需的新血浆 B 细胞的能力。确定哪些药物有这种影响,并监测接受这些药物的患者,将有助于临床医生指导癌症患者,为在治疗的同时确保恢复其免疫系统提供指导。

[ 李静 摘译,田野苹 审阅. Diaz-Muñoz MD, Bell SE, Fairfax K, et al. *Nat Immunol*, 2015, 16( 4 ): 415-425. ]