

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.007

· 研究快报 ·

低氧条件下 RUNX2 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响

林耘,徐双,钱程(第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室,上海 200433)

[摘要] **目的:** 探讨 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 在低氧环境下对小鼠乳腺癌 4T1 细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法:** Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测低氧条件对 4T1 细胞内 *RUNX1*、*RUNX2*、*RUNX3* mRNA 和 RUNX2 蛋白表达的影响;采用小干扰 RNA 技术与真核重组质粒 DNA 过表达技术降低或者提高 4T1 细胞 RUNX2 的表达,免疫共沉淀法检测 4T1 细胞中 RUNX2 与其他蛋白之间的相互结合情况,流式细胞术检测常氧/低氧条件下干扰/过表达 RUNX2 对 4T1 细胞凋亡的影响。**结果:** 低氧条件下 4T1 细胞中 *RUNX1* 和 *RUNX2* mRNA 的表达水平上调 ($P < 0.05$), RUNX2 的蛋白表达量明显增加;转染 RUNX2-siRNA-1415 和真核表达载体 pcDNA3.1(-)-RUNX2 可使 4T1 细胞内 RUNX2 水平明显降低或升高;在常氧或低氧条件下,沉默 *RUNX2* mRNA 的表达均导致小鼠乳腺癌 4T1 细胞凋亡率上升[常氧:(12.83 ± 0.24)% vs (9.3 ± 0.55)%, $P < 0.05$;低氧:(19.77 ± 0.59)% vs (15.13 ± 0.32)%, $P < 0.05$],而过表达 RUNX2 均导致 4T1 细胞凋亡率下降[常氧:(9.97 ± 0.27)% vs (14.07 ± 0.80)%, $P < 0.05$;低氧:(22.43 ± 1.02)% vs (34.93 ± 0.71)%, $P < 0.05$]。在低氧条件下,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α)与 RUNX2 的表达上升,RUNX2 能与 HIF-1 α 形成复合物。**结论:** 在肿瘤低氧微环境中,RUNX2 高表达于小鼠乳腺癌 4T1 细胞中,高表达的 RUNX2 可能是通过与 HIF-1 α 的相互作用而抑制肿瘤细胞的凋亡。

[关键词] 乳腺癌细胞;Runt 相关转录因子 2;RNA 干扰;低氧环境;细胞凋亡

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0373-07

The effect of RUNX2 on apoptosis of mouse breast cancer 4T1 cells under hypoxia

LIN Yun, XU Shuang, QIAN Cheng (National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) on apoptosis of mouse breast cancer 4T1 cells under hypoxia and its mechanism. **Methods:** Western blotting and Real-time PCR were used to measure the effect of hypoxia on the expression levels of *RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3* mRNA and RUNX2 protein in 4T1 cells; small interference RNA (siRNA) and eukaryotic recombinant plasmid DNA over-expression technique were used to down-or up-regulate the RUNX2 expression in 4T1 cells respectively; Co-immunoprecipitation was used to detect the binding of RUNX2 and other proteins in 4T1 cells; Flow cytometry was used for the detection of the effect of down-/up-regulation of RUNX2 on apoptosis of 4T1 cells under normoxic/hypoxic condition. **Results:** The mRNA expression levels of *RUNX1* and *RUNX2* in 4T1 cells were up-regulated under hypoxic condition ($P < 0.05$), and the protein expression of RUNX2 was significantly elevated ($P < 0.05$). Transfection with RUNX2-siRNA-1415 or pcDNA3.1(-)-RUNX2 could significantly decrease or increase the RUNX2 level in 4T1 cells, respectively; Under normoxic/hypoxic condition, apoptosis rate of 4T1 cells that transfected with siRNA-RUNX2-1415 was significantly increased by comparing with negative control group (normoxia: [12.83 ± 0.2404] % vs [9.3 ± 0.5508] %, $P < 0.05$; hypoxia: [19.77 ± 0.59] % vs [15.13 ± 0.32] %, $P < 0.05$); however, the apoptosis rate of 4T1 cells were decreased by over-expressing RUNX2 (normoxia:

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)课题资助项目(No. SS2014AA020801)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. SS2014AA020801)

[作者简介] 林耘(1989-),女,硕士生,主要从事固有免疫和肿瘤免疫的研究,E-mail: linyunzx@163.com

[通信作者] 钱程(QIAN Cheng, corresponding author),博士,副教授,硕士生导师,主要从事固有免疫和肿瘤免疫的研究,E-mail: crystalqiancheng@163.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170413.1025.012.html>

[9.967 ± 0.2728]% vs [14.07 ± 0.7965]%, $P < 0.05$; hypoxia: [22.43 ± 1.02]% vs [34.93 ± 0.71]%, $P < 0.05$). Under hypoxic condition, the expression levels of hypoxic induced factor-1 α (HIF-1 α) and RUNX2 were significantly elevated, and RUNX2 could bind with HIF-1 α to form complex. **Conclusion:** Under the hypoxic micro-environment, 4T1 cells express the high level of RUNX2, in the meanwhile, high level RUNX2 could inhibit the apoptosis of tumor cells by interacting with HIF-1 α .

[**Key words**] breast cancer cells; Runt-related transcription factor 2(RUNX2); RNA interference; Hypoxic environment; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 373-379. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.007]

肿瘤微环境在肿瘤细胞的发生发展以及耐药等多方面发挥着重要的作用,而低氧是肿瘤微环境主要的特点之一。研究^[1]表明,缺氧与肿瘤的增殖、转移、凋亡、血管生成、药物治疗抵抗等密切相关。Runt 相关转录因子(Runt-related transcription factor, RUNX)家族是一类与发育相关的调控分子,主要包括 RUNX1、RUNX2、RUNX3^[2],它们在细胞的分化发育中发挥着重要的作用^[3]。近年来,越来越多的研究^[4-5]表明 RUNX 与肿瘤的发生发展有密切的关系。RUNX2 作为骨细胞的特异性转录因子,能够调节成骨分化、骨发育及 MMP、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨唾液酸蛋白(bone specific sialoprotein, BSP)、VEGF 等肿瘤相关蛋白的表达,不仅与骨肉瘤的形成紧密相关,而且参与乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、肺癌、肝癌等多种肿瘤的发生发展过程^[6]。RUNX3 的失活在许多实体肿瘤如结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌、胃癌等中被检测出^[7]。尤其是近几年, RUNX2 在乳腺癌中的作用备受关注,有研究^[8]显示, RUNX2 在临床预后较差的乳腺癌中高表达,并且 RUNX2 的高表达与乳腺癌的病理分型密切相关。但是, RUNX2 是否可以作为乳腺癌的临床诊断、治疗以及预后的指标目前仍然存在争议。本研究观察了 RUNX2 在低氧环境下对高转移性小鼠乳腺癌细胞系 4T1 细胞凋亡的影响及相互作用蛋白。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与主要试剂

小鼠乳腺癌细胞系 4T1 细胞株由本实验室长期保存。胎牛血清(FBS)购自 invitrogen 公司, RPMI 1640 培养基购自 Life Technologies 公司, jetPEI DNA 转染试剂与 INTERFERin siRNA 干扰试剂购自 Polyplus Transfection 公司, RUNX2 siRNA 与无关对照 siRNA 由上海吉玛生物技术有限公司设计合成, 细胞总 RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司, RNA 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 及 DNA Maker 均购

自 TaKaRa 公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, DNA 限制性内切酶购自 NEB 公司, T4 DNA 连接酶 Ligation high ver. 2 购自 TOYOBO 公司, 抗 RUNX2 抗体、抗缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α)抗体正常兔 IgG 和琼脂糖珠 ProteinA 购自 CST 公司, 抗 β -actin、HRP 标记的山羊抗兔与山羊抗鼠 IgG 均购自 Santa Cruz 公司。M-PER 全细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自 The Thermo Scientific Pierce 公司, Annexin-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自 Sigma-Aldrich 公司。Applied Biosystems QuantStudio 7 flex 荧光定量 PCR 仪购自 Life Technologies 公司。

1.2 小鼠乳腺癌 4T1 细胞的培养

小鼠乳腺癌 4T1 细胞置于含 10% 胎牛血清的普通 RPMI 1640 培养基中培养, 常氧培养条件: 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度; 低氧培养条件: 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、1% O₂ 的饱和湿度。根据细胞生长情况, 1~2 d 后进行传代。

1.3 Real-time PCR 法检测低氧对 4T1 细胞 RUNX1、RUNX2、RUNX3 mRNA 表达量的影响

取对数生长期的 4T1 细胞接种于 24 孔板中 (2 \times 10⁴ 个/孔), 待其贴壁后分别在常氧培养条件下与低氧培养条件下培养 24 h 后收集细胞, 根据细胞总 RNA 提取试剂盒的说明书进行总 RNA 的提取, 按照 TaKaRa 逆转录试剂说明取 500 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA, 取 2 μ l 反应产物加入 20 μ l 反应体系中进行 Real-time PCR, 检测 RUNX1、RUNX2、RUNX3 mRNA 的表达量变化。使用荧光定量 PCR 仪进行分析, 检测基因 mRNA 的特异性引物序列: RUNX1 上游引物为 5'-ACAAGTTGCCACCTACCATAG-3', RUNX1 下游引物为 5'-CAGAGGAAGAGGTGATGGATC-3'; RUNX2 上游引物为 5'-GCTATTAAGTGACACTGGACCG-3', RUNX2 下游引物为 5'-GGCGATCAGAGAACAACACTAG-3'; RUNX3 上游引物为 5'-ACAGCATCTTTGACTCCTTCC-3', RUNX3 下游引物为 5'-TGTTCTCGCCCATCTTGC-3'; β -actin 上

游引物为 5'-GTACTTGCCTCAGGAGGAG-3', β -actin 下游引物为 5'-GTACTTGCCTCAGGAGGAG-3'。Real-time PCR 数据的处理:用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以内参基因 β -actin 的 Ct 值作为标准作归一化处理。

1.4 Western blotting 法检测低氧对 4T1 细胞 RUNX2 蛋白表达的影响

取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔),待其贴壁后分别在常氧培养条件下与低氧培养条件下培养 24 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗一次,加入含 cocktail 蛋白酶抑制剂的 M-PER 全细胞裂解液,冰浴 30 min,用细胞刮子刮下细胞,收集于 1.5 ml EP 管中,以 $15\ 000 \times g$ 离心 10 min,取上清。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,配平蛋白样品,加入 $6 \times$ 上样缓冲液 ($0.125\ \text{mol/L}$ Tris-HCl, 50% 甘油, 0.05% 溴酚蓝, 4% SDS, 5% α -巯基乙醇), $100\ ^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min,进行 10% SDS-PAGE, 100 V 恒压,待蛋白电泳到合适的位置,将胶上的蛋白湿转到硝酸纤维素薄膜 NC 上,恒压 100 V, 90 min。5% 脱脂牛奶封闭 1.5~2 h,用含 5% BSA(牛血清白蛋白) $1 \times$ TBST 稀释特异性一抗 ($1:1\ 000$), $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜, TBST 洗脱液洗膜 (15 min \times 3 次),加 HRP 偶联的二抗 ($1:3\ 000$ 稀释),室温在脱色摇床上摇动 1.5 h 后, TBST 洗脱液洗膜 (15 min \times 3 次),用显色液在天能公司多功能显色仪上显色。实验重复 3 次。

1.5 Real-time PCR 与 Western blotting 检测 siRNA 转染对 4T1 细胞 RUNX2 mRNA 及蛋白表达的影响

取对数生长期 4T1 细胞接种于 24 孔板中 (2×10^4 个/孔),分别转染 RUNX2-siRNA-NC、RUNX2-siRNA-1415,每组 3 个复孔。按照 TaKaRa 的 INTERFERin siRNA 干扰试剂说明书优化转染条件,按照最优转染条件转染 24 h 后收集细胞。按照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,按照 TaKaRa 逆转录试剂说明书取 $500\ \mu\text{g}$ 总 RNA 反转录合成 cDNA,取 $2\ \mu\text{l}$ 反应产物加入 $20\ \mu\text{l}$ 反应体系中进行 Real-time PCR,检测 RUNX2 mRNA 的表达量变化。取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔),待其贴壁后分别转染 RUNX2-siRNA-NC、RUNX2-siRNA-1415, 48 h 后收集细胞,制备 RUNX2 蛋白样品进行 Western blotting 实验。

1.6 RUNX2 真核表达载体的构建及 Western blotting 法检测外源性 RUNX2 在 4T1 细胞中的表达

1.6.1 RUNX2 引物的设计与合成 根据 GenBank NM_001146038.2 的基因序列,采用 SnapGene 软件设计引物。在上游引物的 5' 加入 *Nhe* I 酶切位点,

下游引物的 5' 加入 *Xho* I 酶切位点,引物由上海生物工程股份有限公司合成。引物序列:RUNX2 上游引物为 5'-CTAGCTAGCGCCACCATGGCGTCAAACAGCCTCTT-3'; RUNX2 下游引物为 5'-CCGCTCGAGTGAATATGGCCGCCAAACAGACT-3'。

1.6.2 RUNX2 扩增及产物纯化 以小鼠 4T1 细胞为基因模板,PCR 扩增小鼠 RUNX2 编码序列。PCR 反应条件: $50\ \mu\text{l}$ 体系, $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $98\ ^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $56\ ^\circ\text{C}$ 退火 5 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 12 s, 循环 36 次,再 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,按胶回收试剂盒说明回收、纯化目的产物。

1.6.3 RUNX2 真核表达载体的构建及鉴定 使用 *Nhe* I 与 *Xho* I 限制性内切酶对 RUNX2 纯化产物与真核表达载体质粒 pcDNA3.1(-) 进行酶切,回收、纯化酶切产物。根据 T4 DNA 连接酶连接纯化的酶切产物,转化 DH5 α 感受态细胞,接种于含有氨苄霉素的 LB 培养基平板,筛选阳性单克隆,扩增阳性菌,送赛音生物技术(上海)有限公司测序。

1.6.4 Western blotting 法检测 RUNX2 在 4T1 细胞的表达 取对数生长期 4T1 细胞接种于 12 孔板中 (5×10^4 个/孔),待细胞的汇合度在 50% 左右,设置空载体质粒组与重组质粒组,按照 jetPEI DNA 转染试剂说明书优化转染条件,根据最优转染条件转染质粒 pcDNA3.1(-) 与 pcDNA3.1(-)-RUNX2 质粒, 36 h 后收细胞,制备蛋白样品,行 Western blotting 检测。

1.7 免疫共沉淀法检测 4T1 细胞中 RUNX2 与其他蛋白之间的相互结合情况

取对数生长期 4T1 细胞接种于 6 孔板中 (4×10^5 个/孔),待其贴壁过夜后转染质粒。转染后的细胞在低氧条件下培养 24 h 后提取蛋白,用预冷的 PBS 洗 1 次,加入含 cocktail 蛋白酶抑制剂的 M-PER 全细胞裂解液,冰浴 30 min,收集于 1.5 ml EP 管中,预冷的高速离心机中以 $15\ 000 \times g$ 离心 10 min,取上清。加入正常兔 IgG 和琼脂糖珠 ProteinA 预沉淀 2 h,离心弃去珠子,加入 RUNX2 特异性抗体孵育过夜,然后加入琼脂糖珠 ProteinA 孵育 3 h。用含有 cocktail 蛋白酶抑制剂的 M-PER 全细胞裂解液洗涤 3 次,每次 15 min,弃洗液,加入上样缓冲液,煮沸 10 min,用 Western blotting 法检测 RUNX2 与 HIF-1 α 的表达。

1.8 流式细胞术检测常氧/低氧条件下干扰/过表达 RUNX2 对 4T1 细胞凋亡的影响

取对数生长期 4T1 细胞接种于 24 孔板中 (8×10^3 个/孔),培养过夜后分别转染 RUNX2-siRNA-NC、RUNX2-siRNA-1415、空载体质粒 pcDNA3.1

(-),pcDNA3.1(-)-RUNX2 质粒。转染 24 h 后,分别在常氧与低氧的条件下培养 24 h。胰酶消化细胞,PBS 洗 2 次,100 × g 离心 5 min,细胞处理之后加入 200 μl 结合缓冲液重悬细胞,加入 2 μl AnnexinV-FITC 混匀,再加入 4 μl PI 混匀避光 10 min,1 h 内上流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

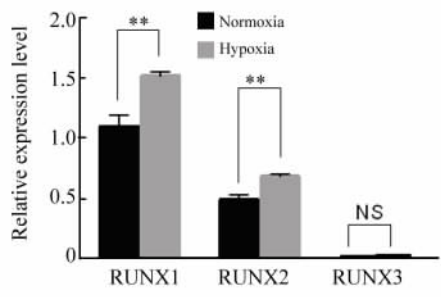
1.9 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧条件下 4T1 细胞中 RUNX1 mRNA 和 RUNX2 mRNA 的表达水平上调

Real-time PCR 检测结果(图 1)显示,RUNX1 mRNA、RUNX2 mRNA 的在 4T1 细胞中的表达水平较 RUNX3 mRNA 高,并且在低氧条件下,RUNX1、RUNX2 mRNA 表达上调($P < 0.01$)。



** $P < 0.01$ vs Normoxia group

图 1 低氧条件下 4T1 细胞 RUNX1、RUNX2、RUNX3 mRNA 的表达

Fig. 1 Expression levels of RUNX1, RUNX2, RUNX3 mRNA in 4T1 cells under normoxia and hypoxia

2.2 低氧条件下 4T1 细胞中 RUNX2 蛋白表达水平上调

Western blotting 检测结果(图 2)显示,与常氧条件下培养的 4T1 细胞相比,低氧条件培养的 4T1 细胞的 RUNX2 蛋白的表达增加。

2.3 转染 RUNX2-siRNA-1415 显著下调 4T1 细胞中 RUNX2 mRNA 与蛋白表达水平

Real-time PCR 与 Western blotting 检测结果(图 3)显示,转染 RUNX2-siRNA-1415 组的 RUNX2 mRNA 表达明显低于对照组(0.493 ± 0.042 vs 1.048 ± 0.033 , $P < 0.05$),RUNX2 蛋白表达也明显

下降。

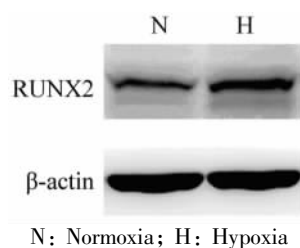
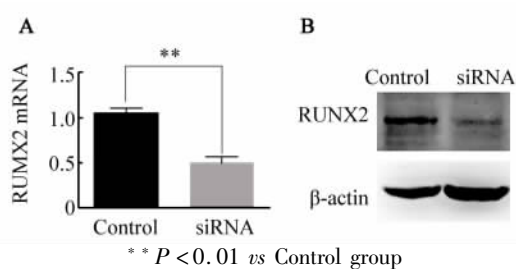


图 2 低氧条件下 RUNX2 在 4T1 细胞中的表达
Fig. 2 Expressions of RUNX2 protein in 4T1 cells under hypoxia



A: Expression levels of RUNX2 mRNA in 4T1 cells;
B: Expression levels of RUNX2 protein in 4T1 cells;

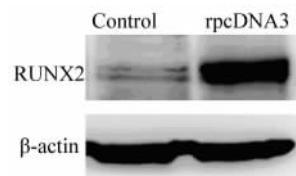
Control: RUNX2-siRNA-NC group;
siRNA: RUNX2-siRNA-1415 group

图 3 转染 RUNX2-siRNA-1415 对 4T1 细胞中 RUNX2 表达的影响

Fig. 3 Expression of RUNX2 mRNA and protein in 4T1 cells were inhibited by RUNX2-siRNA-1415 transfection

2.4 成功构建 pcDNA3.1(-)-RUNX2 质粒及 RUNX2 蛋白在 4T1 细胞的表达

测序结果显示,pcDNA3.1(-)-RUNX2 质粒各个连接位点及阅读框架正确,序列与对应的已知序列相符合。Western blotting 检测结果(图 4)显示,转染 pcDNA3.1(-)-RUNX2 重组质粒组目的蛋白表达大小在 62 kD 处,与预期的结果一致,与转染空载体质粒对比,RUNX2 蛋白的表达水平显著提高。



Control: Empty plasmid group;
rpcDNA3: pcDNA3.1(-)-RUNX2 group

图 4 pcDNA3.1(-)-RUNX2 转染后 4T1 细胞中 RUNX2 蛋白的表达

Fig. 4 Expressions of RUNX2 protein in 4T1 cells after pcDNA3.1(-)-RUNX2 transfection

2.5 在低氧条件下 4T1 细胞中的 RUNX2 能直接与 HIF-1 α 结合

免疫共沉淀结果(图 5)显示,低氧条件下,4T1 细胞中的 RUNX2 能够直接与 HIF-1 α 相互结合,并且真核重组质粒 pcDNA3.1(-)-RUNX2 组的 RUNX2 与 HIF-1 α 结合较空载体显著增加。

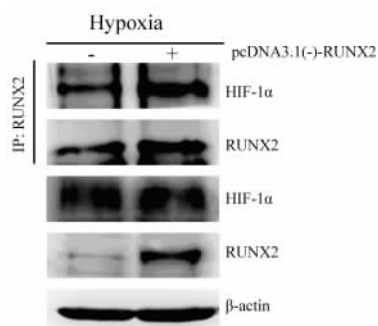


图 5 低氧条件下 4T1 细胞中 RUNX2 与 HIF-1 α 结合

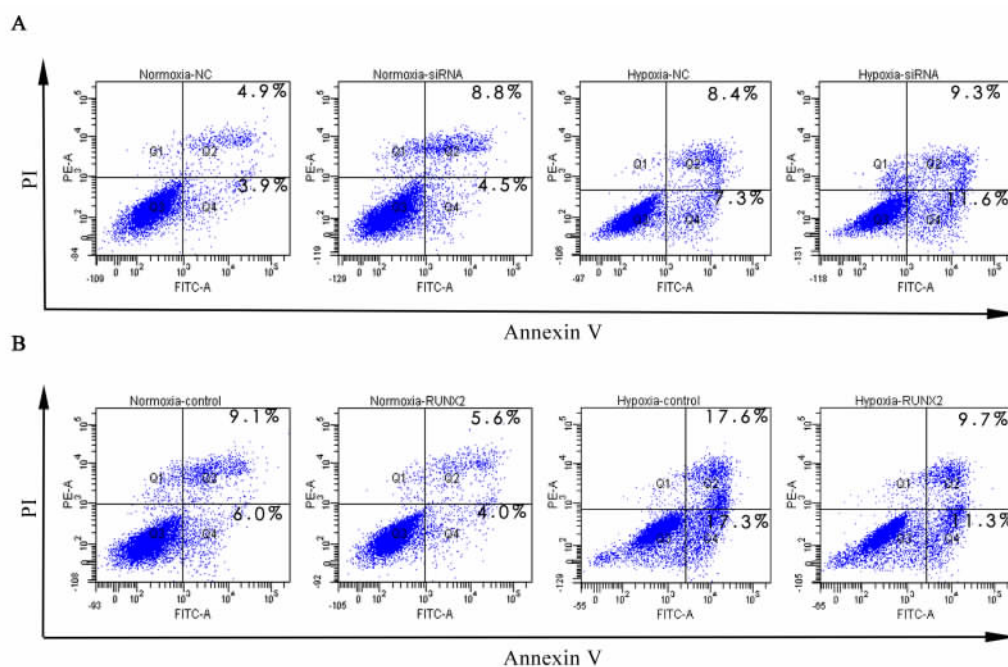
Fig. 5 RUNX2 interacted with HIF-1 α in 4T1 cells under hypoxia

2.6 下调 RUNX2 的表达促进 4T1 细胞的凋亡,上调 RUNX2 的表达抑制 4T1 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 6)显示,在常氧与低氧条件下,沉默 RUNX2 的表达,小鼠乳腺癌细胞凋亡率均上升[$(12.83 \pm 0.24)\%$ vs $(9.30 \pm 0.55)\%$, $P < 0.05$; $(19.77 \pm 0.59)\%$ vs $(15.13 \pm 0.32)\%$, $P < 0.05$],而过表达 RUNX2 后,其凋亡率下降[$(9.97 \pm 0.27)\%$ vs $(14.07 \pm 0.80)\%$, $P < 0.05$; $(22.43 \pm 1.017)\%$ vs $(34.93 \pm 0.71)\%$, $P < 0.05$]。

3 讨论

肿瘤生长微环境在肿瘤的发生发展及治疗中具有重要作用,大于 1 mm^3 的实体瘤中,肿瘤细胞就处在低氧环境中^[9]。在低氧环境下,肿瘤细胞的某些基因转录活性发生改变,使得肿瘤细胞适应低氧环境,并且引起肿瘤的生长、血管生成、转移、凋亡



A: Silencing RUNX2; B: Overexpressing RUNX2 ;

NC: RUNX2-siRNA-NC group; siRNA: RUNX2-siRNA-1415 group;

Control: empty plasmid group; RUNX2: pcDNA3.1(-)-RUNX2 group

图 6 常氧/低氧环境下沉默/过表达 RUNX2 对 4T1 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effects of silencing or overexpressing RUNX2 on apoptosis rates of 4T1 cells under normoxia or hypoxia

等^[10]。其中,HIF-1 α 稳定表达于低氧环境下的肿瘤细胞中^[11],笔者研究也发现在低氧条件下小鼠乳腺癌 4T1 细胞中 HIF-1 α 较高表达。HIF-1 α 的高表达是由于 HIF-1 α 的降解减少,而在常氧环境中,脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylases, PHDS)羟化 HIF-

1 α ,进而招募 pVHL-ElonginB-ElonginC-cullin2 复合体介导的,该复合体具有 E3 泛素连接酶活性,进而靶向 HIF-1 α 的蛋白酶体降解^[12]。

本研究主要是通过 siRNA 技术降低内源性 RUNX2 的表达,以及转染重组 RUNX2 的质粒增加

外源性 RUNX2 的表达,从而检测 RUNX2 表达的变化对小鼠高转移性乳腺癌细胞 4T1 细胞系凋亡情况的影响,以及在低氧环境下,RUNX2 在 4T1 细胞中对凋亡的作用。笔者发现降低 RUNX2 的表达提高了 4T1 细胞的凋亡率,上调 RUNX2 的表达降低了 4T1 细胞的凋亡率,并且在低氧环境中得到了同样的结果。细胞的凋亡在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,与凋亡相关的分子家族主要有 Caspases、某些接头蛋白、Bcl-2 以及凋亡抑制蛋白 IAPs,在低氧环境下,凋亡相关基因如 Bcl-2、IAP 以及 Caspases-3 的表达及活性受到调节^[13-14]。一般情况下,低氧能够通过促凋亡机制的作用诱导细胞的凋亡,而另一方面,低氧条件下的适应性反应以及促增殖的信号能抗凋亡,所以,调节肿瘤细胞的适应性反应与促凋亡信号之间的平衡对于肿瘤耐药性的研究至关重要^[15-16]。在人的肾肿瘤中,HIF-1 α 能够与 P53 协同调节 mTOR 与 MDM2 依赖的凋亡信号^[17],而 P53 作为一个肿瘤抑制基因,已经被广泛研究。在 P53 突变的胰腺癌细胞中,RUNX2 的缺失能够通过增加促凋亡基因 *TAp63* 的产生从而增加对化疗药物的敏感性^[18]。RUNX2 能与 P53、HDAC6 相互作用形成复合物,HDAC6 的抑制剂能够增强阿霉素诱导的 P53 靶向基因的表达,说明 HDAC6 的去乙酰化酶活性需要 RUNX2 介导的 P53 靶向基因表达的下调,RUNX2 能够抑制 P53 介导的细胞的 DNA 损伤^[19]。本研究发现,RUNX2 高表达于 4T1 细胞中,缺氧情况下,RUNX2 的表达上调,并且 RUNX2 能够抑制细胞的凋亡,由 RUNX2 所引起的凋亡变化很可能是抑制了细胞的 DNA 损伤引起的。本研究就小鼠高转移性细胞系 4T1 细胞展开研究,RUNX2 在正常氧或者缺氧条件下对 4T1 细胞的凋亡都有抑制作用。本研究的结果还显示,低氧条件下,4T1 细胞中的 RUNX2 能够直接与 HIF-1 α 相互结合。而有研究^[20]报道,在肥大软骨细胞中,RUNX2 也能与 HIF-1 α 相互结合,阻断 HIF-1 α 与 pVHL 的相互作用,抑制 HIF-1 α 的降解,从而刺激血管的生成。RUNX2 与 HIF-1 α 相互作用对凋亡影响的机制需要进一步的研究,而 RUNX2 能够有效的抑制高转移性乳腺癌细胞的凋亡,为 RUNX2 在高转移性乳腺癌治疗的后续研究提供一定的理论基础。

[参 考 文 献]

[1] YI T,PAPADOPOULOS E,HAGNER P R,et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α) promotes cap-dependent translation of selective mRNAs through up-regulating initiation factor eIF4E1 in

breast cancer cells under hypoxia conditions[J]. J Biol Chem, 2013, 288 (26): 18732-18742. DOI: 10. 1074/jbc. M113. 471466.

- [2] 林斌,钱程. Runt 相关转录因子家族在肿瘤发生发展中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(6):846-851. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385X. 2016. 06. 019.
- [3] VOON D C, HOR Y T, ITO Y. The RUNX complex: reaching beyond haematopoiesis into immunity[J]. Immunology, 2015, 146 (4): 523-536. DOI: 10. 1111/imm. 12535.
- [4] ITO Y, BAE S C, CHUANG L S. The RUNX family: developmental regulators in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(2): 81-95. DOI: 10. 1038/nrc3877.
- [5] PAPAEMMANUIL E, RAPADO I, LI Y, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia[J]. Nat Genet, 2014, 46(2): 116-125. DOI: 10. 1038/ng. 2874.
- [6] COHEN-SOLAL K A, BOREGOWDAAND R K, LASFAR A. RUNX2 and the PI3K/AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression[J/OL]. Mol Cancer, 2015, 14: 137 [2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4513933/>. DOI:10. 1186/s12943-015-0404-3.
- [7] CHUANG L S, ITO K, ITO Y. RUNX family: regulation and diversification of roles through interacting proteins[J]. Int J Cancer, 2013, 132(6): 1260-1271. DOI: 10. 1002/ijc. 27964.
- [8] CHIMGE N O, LITTLE G H, BANIWAL S K, et al. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and β -catenin activation in ER-positive breast cancer[J/OL]. Nat Commun, 2016, 7: 10751 [2017-01-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4773428>. DOI:10. 1038/ncomms 10751.
- [9] LEE S H, KIM J, KIM W H, et al. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2009, 28(2): 184-194. DOI:10. 1038/onc. 2008. 377.
- [10] NOMURA A, DAUER P, GUPTA V, et al. Microenvironment mediated alterations to metabolic pathways confer increased chemoresistance in CD133⁺ tumor initiating cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56324-56337. DOI:10. 18632/oncotarget. 10838.
- [11] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 2016, 352(6282): 175-180. DOI: 10. 1126/science. aaf4405.
- [12] LEE S H, BAE S C, KIM K W, et al. RUNX3 inhibits hypoxia inducible factor-1 α protein stability by interacting with prolyl hydroxylases in gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2014, 33(11): 1458-1467. DOI:10. 1038/onc. 2013. 76.
- [13] CAO L, QUAN X B, ZENG W J, et al. Mechanism of hepatocyte apoptosis [J/OL]. J Cell Death, 2016, 9: 19-29 [2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5201115/>. DOI:10. 4137/JCD. S39824.
- [14] KIRAZ Y, ADAN A, KARTAL YANDIM M, et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 8471-8486. DOI:10. 1007/s13277-016- 5035-9.
- [15] ZHOU J, SCHMID T, SCHNITZER S, et al. Tumor hypoxia and cancer progression[J]. Cancer Lett, 2006, 237(1): 10-21. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2005. 05. 028.

- [16] MUZ B, DE LA PUENTE P, AZAB F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy[J/OL]. Hypoxia(Auckl), 2015, 3: 83-92[2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045092/>. DOI: 10. 2147/HP. S93413.
- [17] LIU Q J, SHEN H L, LIN J, et al. Synergistic roles of p53 and HIF-1 α in human renal cell carcinoma-cell apoptosis responding to the inhibition of mTOR and MDM2 signaling pathways[J/OL]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 745-755[2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4762585/>. DOI: 10. 2147/DDDT. S88779.
- [18] OZAKI T, NAKAMURA M, OGATA T, et al. Depletion of pro-oncogenic RUNX2 enhances gemcitabine (GEM) sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer Panc-1 cells through the induction of pro-apoptotic TA63[J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71937-71950. DOI: 10. 18632/oncotarget. 12433.
- [19] OZAKI T, WU D, SUGIMOTO H, et al. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage[J/OL]. Cell Death Dis, 2013, 4: e610[2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3641350/>. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 127.
- [20] LEE S H, CHE X, JEONG J H, et al. Runx2 protein stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α through competition with von Hippel-Lindau protein (pVHL) and stimulates angiogenesis in growth plate hypertrophic chondrocytes[J]. J Biol Chem, 2012, 287(18): 14760-14771. DOI: 10. 1074/jbc. M112. 340232.
- [收稿日期] 2017-01-10 [修回日期] 2017-03-15
[本文编辑] 王映红

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] ABRAMS W B, BEERS M H, BERKOW R. 默克老年病手册[M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]//专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] WEINSTEIN L, SWARTZ M N. Pathogenic properties of invading microorganisms[M]//SODERMAN W A Jr, SODEMAN W A. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页. DOI.

- [1] NOBLES K N, GUAN Z, XIAO K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and-2[J]. J Biol Chem, 2007, 282(29): 21370-21381. DOI: 10. 1074/jbc. M611483200.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839[P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系[D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径. DOI.

- [1] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J/OL]. Sci Transl Med, 2011, 3: 95ra73 [2016-06-08]. <http://stm.sciencemag.org/content/3/95/95ra73.long>. DOI: 10. 1126/scitranslmed. 3002842.
- [2] HOPKINSON A. UNIMARC and metadata: Dublin core[EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.