

RSK4 对乳腺癌细胞增殖侵袭黏附相关基因表达水平的影响

李德全, 韩璐璐, 刘剑仑

(广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021)

摘要: [目的] 探讨核糖体 S6 蛋白激酶 4 (ribosomal protein S6 kinase 4 gene, *RSK4*) 基因对乳腺癌细胞 *Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4*、*HIF-1 α* 、*E-cadherin* 基因转录影响。[方法] 分别构建 *RSK4* 干扰载体、过表达载体转染至乳腺癌 MCF-7 细胞及 MDA-MB-231 细胞中, RT-PCR 比较实验组和对照组 *Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4*、*HIF-1 α* 及 *E-cadherin* mRNA 表达水平。[结果] 干扰组 *CXCR4*、*HIF-1 α* 、*cyclinD1* 及 *Ki-67* mRNA 的转录水平分别为 2.238 ± 0.0711 、 1.672 ± 0.0833 、 1.540 ± 0.0115 、 1.390 ± 0.0902 , 与空白对照组、阴性对照组相比均升高, 但 *E-cadherin* mRNA 的转录水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。过表达组 *Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4* 和 *HIF-1 α* 转录水平分别是 0.603 ± 0.0066 、 0.460 ± 0.0155 、 0.424 ± 0.0198 、 0.205 ± 0.0082 , 与空白对照组、阴性对照组相比均降低, 而 *E-cadherin* mRNA 转录水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] *RSK4* 基因表达影响乳腺癌细胞增殖黏附相关基因 *Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4*、*HIF-1 α* 和 *E-cadherin* mRNA 转录水平。

主题词: 核糖体 S6 蛋白激酶 4 (*RSK4*); 乳腺肿瘤; 肿瘤转移; 细胞黏附

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)09-0665-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.09.B001

Effects of *RSK4* on Cell Proliferation, Invasion and Adherence Related Genes in Breast Cancer Cells

LI De-quan, HAN Lu-lu, LIU Jian-lun

(Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of *RSK4* gene expression on *CXCR4*, *HIF-1 α* , *cyclinD1*, *Ki-67* and *E-cadherin* mRNA in breast cancer cells. [Methods] *RSK4* interference lentiviral vector (*RSK4*-RNAi-LV) and overexpression lentiviral vector (LV-RPS6KA6) were transfected to MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells respectively. Gene expression levels of *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4*, *HIF-1 α* and *E-cadherin* were detected by RT-PCR. [Results] mRNA expression levels of *CXCR4*, *HIF-1 α* , *cyclinD1* and *Ki-67* in RNAi group (2.238 ± 0.0711 , 1.672 ± 0.0833 , 1.540 ± 0.0115 , 1.390 ± 0.0902) were higher than those of controls, except *E-cadherin* ($P < 0.05$). The transcription levels of *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4* and *HIF-1 α* in the overexpression group (0.603 ± 0.0066 , 0.460 ± 0.0155 , 0.424 ± 0.0198 , 0.205 ± 0.0082) were lower than those of controls, except *E-cadherin* ($P < 0.05$). [Conclusion] *RSK4* gene plays an important role in the transcription of *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4*, *HIF-1 α* and *E-cadherin*.

Subject words: *RSK4* (ribosomal protein S6 kinase4); breast neoplasms; neoplasm metastasis; cell adherence

乳腺癌是我国女性最常见的肿瘤之一, 乳腺癌患者的预后与肿瘤细胞的恶性程度有关。细胞增殖、

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960427); 广西自然科学基金资助项目 (0991231)

通讯作者: 刘剑仑, 科主任, 教授, 博士; 广西医科大学附属肿瘤医院 乳腺外科, 广西壮族自治区南宁市河堤路 71 号; E-mail: jianlunliu@hotmail.com

收稿日期: 2013-06-24; **修回日期:** 2013-08-11

侵袭、黏附能力越强, 乳腺癌患者预后越差。核糖体 S6 蛋白激酶 4 (ribosomal protein S6 kinase4, *RSK4*) 作为一个 X 染色体连锁基因, 具有抑制细胞生长、增殖和分化的功能。干扰低转移低侵袭性的 MCF-7 细胞株中 *RSK4* 基因表达, 可使该细胞的增殖侵袭转移能力增加^[1]。然而, *RSK4* 基因对肿瘤细胞侵袭、

黏附能力的改变是通过哪些基因发挥作用目前还不清楚。*Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4*、*HIF-1α*、*E-cadherin* 都是与细胞增殖、侵袭和黏附有关的基因,本研究拟通过干预不同乳腺癌细胞株中 *RSK4* 基因的表达水平,研究细胞增殖、黏附相关基因的改变,初步探讨 *RSK4* 基因影响乳腺癌细胞增殖、黏附、侵袭能力的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 及 MCF-7(中国科学院,上海),高糖 DMEM,胎牛血清 (GIBCO 公司,美国);RT-PCR 试剂盒 (Fermentas、美国);慢病毒干扰载体 (*RSK4*-RNAi-LV)(吉凯,上海),慢病毒过表达载体 (LV-RPS6KA6)(吉凯,上海);慢病毒阴性对照载体 (LVCON145)(吉凯,上海);*RSK4* 引物和 *GAPDH* (生工,上海);兔抗人 *RSK4* 一抗 (Anbo,美国);山羊抗兔和山羊抗鼠二抗 (BioRad,武汉)。

1.2 细胞培养

MCF-7、MDA-MB-231 细胞株于含 10%胎牛血清 DMEM 培养液在 37℃培养。

1.3 细胞转染

设计干扰靶点序列 U6-vshRNA-CMV-GFP 及 *RSK4* 过表达慢病毒载体 (LV-RPS6KA6),分别稳定转染至乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中。设空白对照组 (Con1、Con2),实验组 (干扰组和过表达组即 RNAi 组和 OE 组) 和阴性对照组 (Mock1、Mock2)。每组 3 个平行孔,显微镜下计数后接种 3×10^5 /ml 个细胞于六孔板中,24h 后吸去培养液,进行转染,按 MOI=20 进行。Con1、Con2 组仅加入 1ml 无血清的细胞培养液;RNAi/OE 组和 Mock1、Mock2 组分别加入 1×10^8 TU/ml *RSK4*-RNAi-LV 40μl 及过表达病毒 LV-RPS6KA6 40μl, 1×10^8 TU/ml 阴性对照病毒 LVCON145 40μl (慢病毒均由 EniS 稀释),再各加入 50μg/ml Polybrene 100μl,最后用无血清细

胞培养液将每孔液体量调至 1ml。放置常规培养,换液和传代处理,60h、84h 用荧光显微镜观察其转染率。

细胞总 RNA 提取 (Trizol 法)后,用 RNA 紫外分光光度仪探头进行定量分析 RNA 样品纯度。取总 RNA 4μg,按试剂盒说明进行逆转录 cDNA。

1.4 实时荧光定量 PCR 扩增反应

实时荧光定量 PCR 按 Quant SYBR Green PCR 试剂盒说明书操作。PCR 反应条件:①预变性 95℃ 5min。②变性、退火及延伸(35 个循环)95℃ 45s,退火温度 45s,72℃ 45s,退火温度选取 55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃。③延伸 72℃ 10min。根据引物设计原则,应用 Prime6 软件设计引物 (Table 1)。

Table 1 The list of primers

Genes	Primer(5'→3')	
	Upstream primer	Downstream primer
<i>RSK4</i>	CTTCGAGGAGAAAATGGACTTCT	TGGAGTGTAGCCAGCCAACATT
<i>GAPDH</i>	ATGCCTCACACGGAGACTGT	AGGGCTGTCCTGAATAAGCA
<i>Ki-67</i>	GGGTTACCTGGTCTTAGTT	ATGGTTGAGGCTGTTC
<i>CyclinD1</i>	GATGCCAACCTCCTCAACGAC	CTCCTCGCACTTCTGTTCCTC
<i>CXCR4</i>	AACCTCCTATGCAAGGCAGT	TATCTGTCATCTGCCTCACT
<i>HIF-1α</i>	TTACAGCAGCCAGACGATCA	CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT
<i>E-cadherin</i>	GAATGACAAACAAGCCCGAAT	GACCTCCATCACAGAGGTTCC

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行数据统计学处理。结果以均数±标准差表示。多个样本均数比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰载体与过表达载体转染细胞荧光显微镜观察转染效率

慢病毒干扰载体 *RSK4*-RNAi-LV 和病毒阴性对照载体 LV-scrRNAi 感染乳腺癌细胞 MCF-7 后,60h 检测到荧光表达,84h 表达明显增强。转染的细胞内荧光物质多,间接反映出转染水平高,与 Con1 组及 Mock1 组比较,RNAi 组转染率最高(Figure 1,2)。

慢病毒过表达载体 LV-RPS6KA6 和病毒阴性对照载体 LVCON145 感染乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后,60h 开始检测到荧光表达,84h 表达明显增强。与 Con2 组及 Mock2 组比较,OE 组转染率最高(Figure 3,4)。

2.2 干扰后 *RSK4* mRNA 表达水平变化比较

RNAi 组与 Con1 组比较, 干扰后 MCF-7 细胞的 *RSK4* mRNA 表达水平被显著抑制, 相对表达率仅为 0.9%, Mock1 组的表达水平接近 Con1 组, 差异有统计学意义 (Table 2)。

2.3 干扰后增殖、黏附、侵袭相关基因 mRNA 表达水平变化

RNAi 组 *CXCR4*、*HIF-1 α* 、*cyclinD1* 及 *Ki-67* mRNA 的转录水平与 Con1 组、Mock1 组相比均升高, 但 *E-cadherin* mRNA 的转录水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 3, Figure 5)。

2.4 过表达组与对照组 *RSK4* mRNA 表达水平比较

与 Con2 组比较, OE 组细胞 *RSK4* mRNA 相对表达水平显著升高, 相对表达率为 222.6%, 差异有统计学意义 (Table 4)。

2.5 OE 组细胞增殖、黏附、侵袭相关基因 mRNA 表达水平变化

OE 组 *Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4* 和 *HIF-1 α* 转录水平与 Con2 组、Mock2 组相比均降低, 而 *E-cadherin* mRNA 转录水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 5, Figure 6)。

3 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 侵袭和转移是影响乳腺癌患者预后的重要因素。近年来有研究发现, *RSK4* 基因与乳腺癌细胞的增殖、迁

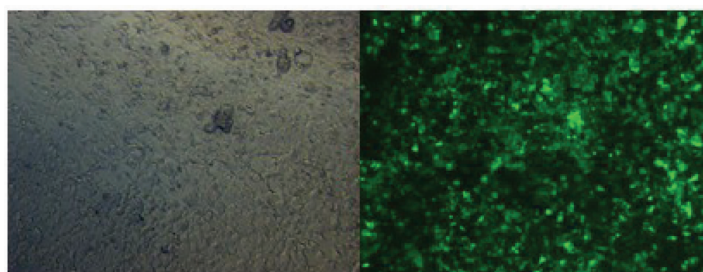


Figure 1 The comparison between the normal and fluorescence from RNAi group transfection on 84h($\times 100$)

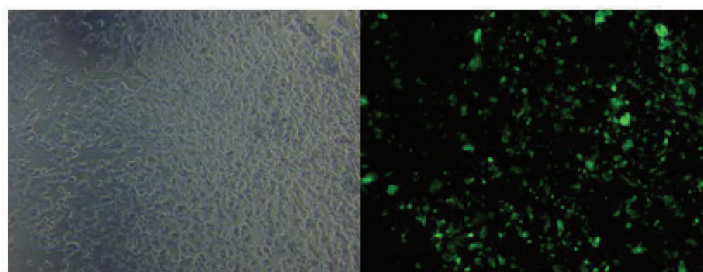


Figure 2 The comparison between the normal and fluorescence from Mock1 group transfection on 84h($\times 100$)

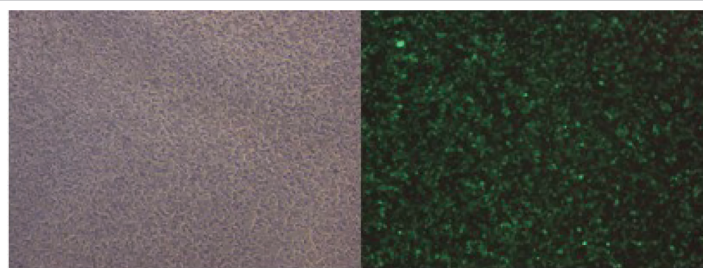


Figure 3 The comparison between the normal and fluorescence from OE group transfection on 84h($\times 100$)

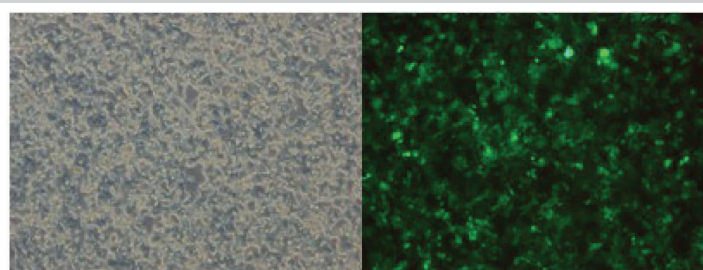


Figure 4 The comparison between the normal and fluorescence from Mock2 group transfection on 84h($\times 100$)

Table 2 The difference of *RSK4* mRNA expression level between RNAi group and controls

Groups	<i>RSK4</i> mRNA
Con1	1.000 $\pm$ 0.0000
RNAi	0.009 $\pm$ 0.0049*
Mock1	0.842 $\pm$ 0.0046

*: Compared with Con1 and Mock1, $P<0.05$.

Table 3 The difference of *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4*, *HIF-1α* and *E-cadherin* mRNA transcription levels between RNAi group and controls

Groups	<i>Ki-67</i>	<i>cyclinD1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>HIF-1α</i>	<i>E-cadherin</i>
Con1	1.000±0.0000	1.000±0.0000	1.000±0.0000	1.000±0.0000	1.000±0.0000
RNAi	1.390±0.0902*	1.540±0.0115*	2.238±0.0711*	1.672±0.0833*	0.035±0.0018*
Mock1	0.474±0.0376	0.789±0.0209	0.637±0.0384	0.493±0.0363	0.591±0.0224

*:Compared with Con1 and Mock1, *P*<0.05.

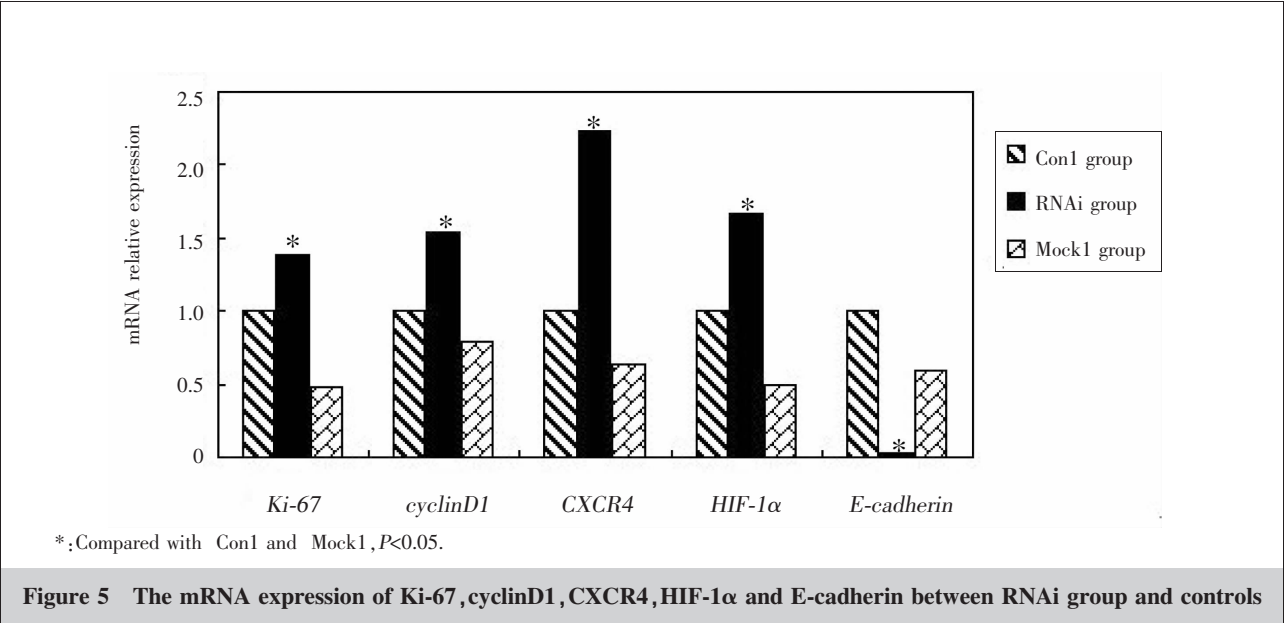


Table 4 2 The difference of *RSK4* mRNA expression levels between OE group and controls

Groups	<i>RSK4</i> mRNA
Con2	1.000±0.0000
OE	2.226±0.0863*
Mock2	1.163±0.0519

*:Compared with Con2 and Mock2, *P*<0.05.

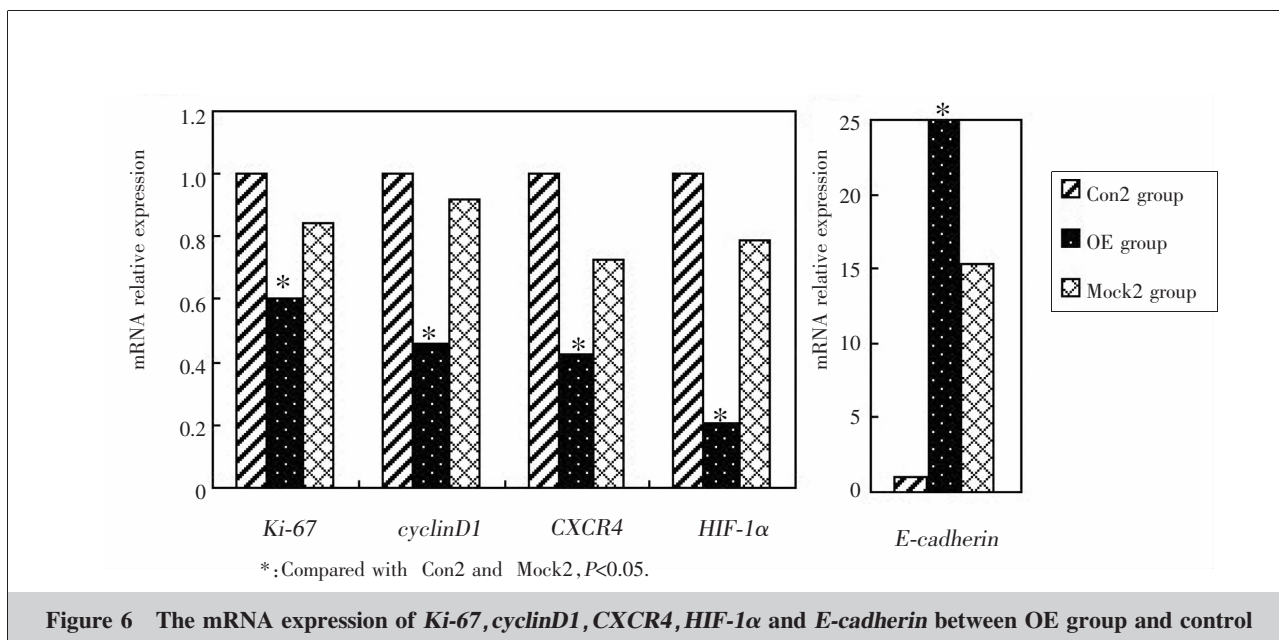
移、侵袭有着密切关系。目前研究认为, *RSK4* 基因在肿瘤细胞高表达, 使 $G_0\sim G_1$ 期细胞的 Rb 蛋白发生磷酸化, 上调 p21 蛋白表达的表达式, 使细胞阻滞在 G_1 期, 从而抑制肿瘤细胞的增殖及侵袭转移^[2]。本研究发现, 乳腺癌 MCF-7 细胞干扰 *RSK4* 基因表达后, 细胞增殖相关基因 *Ki-67* 和 *cyclinD1* 以及细胞侵袭迁移相关基因 *CXCR4* 和 *HIF-1α* 表达水平显著升高, 而过表达 *RSK4* 基因的 MDA-MB-231 细胞中 *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4* 和 *HIF-1α* 表达水平降低。实验结果提示 *RSK4* 基因的表达可影响 *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4*, *HIF-1α* 和 *E-cadherin* mRNA 转录水平, 这可能与 *RSK4* 使细胞停滞于 G_1 期后阻

止了 *Ki-67* 的产生, 从而减低了细胞的增殖能力有关。同时, *RSK4* 促使 Rb 蛋白磷酸化后降低了 *cyclinD1* 与蛋白激酶复合体的结合, 从而阻碍了 *cyclinD1* 进入细胞 S 期, 抑制了细胞的增殖。*Ki-67* 是一种与细胞增殖相关的核抗原, 也是目前应用最广泛的细胞增殖标记之一。乳腺癌组织中 *Ki-67* 阳性表达越大, 细胞增殖越活跃, 肿瘤生长速度快, 侵袭性高, 转移的机会大, 预后差^[3,4]。*cyclinD1* 是参与细胞周期 G_1 期到 S 期转化的关键正性调节因子, 从而促进细胞的增殖与恶性增生^[5]。研究发现^[6]: 乳腺癌 *cyclinD1* 过度表达者无复发生存率和总生存率均明显高于低水平者, 提示 *cyclinD1* 与乳腺癌患者的预后也有着密切的关系。*CXCR4* 在损伤修复、造血干细胞迁移以及恶性肿瘤浸润转移等方面发挥着重要的作用^[7]。研究表明^[8]: *CXCR4* 促进乳腺癌淋巴转移; *HIF-1α* 在乳腺癌前病变以及乳腺癌肿瘤组织中高表达, 而在乳腺良性病变中则低表达, 而且与乳腺癌的发生、发展密切相关^[9]。另有研究显示对于有淋

Table 5 The difference of *Ki-67*, *cyclinD1*, *CXCR4*, *HIF-1 α* and *E-cadherin* mRNA transcription levels between OE group and controls

Groups	<i>Ki-67</i>	<i>cyclinD1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>HIF-1α</i>	<i>E-cadherin</i>
Con2	1.000 $\pm$ 0.0000	1.000 $\pm$ 0.0000	1.000 $\pm$ 0.0000	1.000 $\pm$ 0.0000	1.000 $\pm$ 0.0000
OE	0.603 $\pm$ 0.0066*	0.460 $\pm$ 0.0155*	0.424 $\pm$ 0.0198*	0.205 $\pm$ 0.0082*	24.930 $\pm$ 0.3457*
Mock2	0.474 $\pm$ 0.0376	0.789 $\pm$ 0.0209	0.637 $\pm$ 0.0384	0.493 $\pm$ 0.0363	0.591 $\pm$ 0.0224

*:Compared with Con2 and Mock2, $P < 0.05$.



巴结转移的乳腺癌患者, *HIF-1 α* 表达增高, 且与生存期缩短有相关性, 是一个独立的不良预后指标^[10]。

本研究还发现, 在干扰 *RSK4* 基因后 MCF-7 细胞黏附因子 *E-cadherin* 的 mRNA 比干扰前降低了 96.5%, 而过表达 *RSK4* 基因后 MDA-MB-231 细胞中的 *E-cadherin* 比过表达前提高了 2393%。已有研究结果证实将 *E-cadherin* 的 cDNA 转染入高浸润型癌细胞后, 细胞浸润能力消失, 而将 *E-cadherin* 反义 mRNA 导入癌细胞后, 又可重新诱发浸润反应, *E-cadherin* 低表达的乳腺癌病人的无病生存率比 *E-cadherin* 高表达者显著缩短^[11], 这说明 *E-cadherin* 对肿瘤细胞有抑制作用。

总之, 肿瘤细胞的生物学特性和细胞增殖、侵袭、黏附密切相关。*Ki-67*、*cyclinD1*、*CXCR4*、*HIF-1 α* 、*E-cadherin* 等基因都是反映细胞增殖、侵袭、黏附水平的基因。本研究证实 *RSK4* 基因干扰和过表达对乳腺癌细胞黏附相关基因 *E-cadherin* 的影响最大, 其次是侵袭迁移相关基因, 而对增殖相关基因的影

响最小。肿瘤细胞的黏附性是其侵袭迁移的重要因素, 我们推测 *RSK4* 基因主要通过影响细胞的黏附能力, 从而干预乳腺癌细胞的扩散和进展, 深入研究 *RSK4* 基因的作用机制, 将为乳腺癌的治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Han LL, Liu JL, Wei W. Inhibition of *RSK4* gene expression in the breast cancer cell line MCF-7 using lentiviral vector-mediated shRNA interference[J]. Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2013, 5 (1): 20-23. [韩璐璐, 刘剑仑, 韦薇. 慢病毒介导 shRNA 干扰乳腺癌 MCF-7 细胞 *RSK4* 基因表达的影响 [J]. 中国癌症防治杂志, 2013, 5 (1): 20-23.]
- [2] Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and Antimetastatic activities of ribosomal protein s6 kinase 4 in breast cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (14): 4427-4436.
- [3] Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, et al. Ki-67 index in in-

- tracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker[J]. *Histopathology*, 2008, 53(1): 39–47.
- [4] Wu L, Tian L. Expression and clinical significance of EGFR, Ki-67 and MMP-9 in breast cancer[J]. *Shandong Medical Journal*, 2009, 49(38): 85–86. [吴利, 田亮. 乳腺癌组织中 EGFR、Ki-67、MMP-9 的表达变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2009, 49(38): 85–86.]
- [5] Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclinD1 gene amplification [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 8009–8016.
- [6] Han S, Park K, Bae BN, et al. Prognostic implication of cyclinE expression and its relationship with cyclinS1 and p27^{kepl} expression on tissue microarrays of node negative breast cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2003, 83(4): 241–247.
- [7] Shadidi KR, Aarvak T, Henriksen JE, et al. The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of Th1 cells into rheumatoid synovial tissue[J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(2): 192–198.
- [8] Kato M, Kitayama J, Kazama S, et al. Expression of CXCR4 chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma [J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(5): 144–150.
- [9] Park SW, Chung NG, Hur SY, et al. Mutational analysis of hypoxia-related genes HIF1 α and CUL2 in common human cancers[J]. *APMIS*, 2009, 117(12): 880–885.
- [10] Bos R, van der Groep P, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2003, 97(3): 1573–1581.
- [11] Wang H, Nan L, Yu D, et al. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel therapeutic approach to human breast cancer: in vitro and in vivo activities and mechanisms[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11): 3613–3624.

关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将稿件处理费20元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到稿件处理费和上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,本刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《肿瘤学杂志》网址:<http://www.chinaoncology.cn>。

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。

《肿瘤学杂志》编辑部