

乳腺癌细胞中下调 *RABEX-5* 对其化疗敏感性的影响^{*}

张翔, 厉红元[△], 闵捷, 李焰, 刘强, 梁欣洁

重庆医科大学附属第一医院 内分泌乳腺外科 (重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨 *RABEX-5* 下调表达后, 乳腺癌细胞对蒽环类药物和紫杉类药物的敏感性变化。方法 构建 *RABEX-5* RNAi 慢病毒表达载体, 并感染人乳腺癌细胞株 MCF-7, 使细胞内 *RABEX-5* 基因表达沉默, Real-time PCR、Western blot 方法检测沉默效应。应用 CCK-8 方法检测 *RABEX-5* 沉默后 (MCF-7/RNAi), 与其阴性对照人乳腺癌细胞株 (MCF-7/vector) 相比对化疗药物敏感性的变化情况。结果 *RABEX-5* RNAi 慢病毒表达载体感染 MCF-7 后, 与未干扰组 (MCF-7) 及阴性对照组 (MCF-7/vector) 相比, *RABEX-5* 的 mRNA 和蛋白水平表达下调。与阴性对照组相比, *RABEX-5* 下调表达后, 对蒽环类药物表柔比星的化疗敏感性降低, 半数致死浓度 (IC_{50}) 分别为 $(3.590\ 0 \pm 0.228\ 69)\ \mu\text{g/mL}$ 、 $(1.193\ 3 \pm 0.187\ 71)\ \mu\text{g/mL}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而对紫杉类药物多西他赛的敏感性不变, 半数致死浓度 (IC_{50}) 分别为 $(11.162\ 7 \pm 0.210\ 26)\ \mu\text{g/mL}$ 、 $(10.536\ 7 \pm 0.430\ 97)\ \mu\text{g/mL}$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 *RABEX-5* 下调表达使人乳腺癌细胞 MCF-7 对蒽环类药物表柔比星产生耐药, 而对紫杉类药物多西他赛敏感, 为进一步研究 *RABEX-5* 在乳腺癌个体化治疗中的作用提供理论基础。

【关键词】 *RABEX-5* 人乳腺癌细胞 MCF-7 表柔比星 多西他赛 化疗敏感性

The Effect of *RABEX-5* Downregulation on the Chemosensitivity of Human Breast Cancer Cells ZHANG Xiang, LI Hong-yuan[△], MIN Jie, LI Yan, LIU Qiang, LIANG Xin-jie. Department of Endocrine and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[△] Corresponding author, E-mail: hongy_li@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the changes in sensitivity to anthracycline and taxanes of human breast cancer cells after *RABEX-5* downregulated. **Methods** By constructing a lentiviral vector for RNA interference (RNAi) of *RABEX-5* gene and transfected into human breast cancer cell line MCF-7 to silence the express of *RABEX-5*. Real-time PCR and Western blot were used to detect the silencing effect. The changes in sensitivity to chemotherapeutic drugs of MCF-7/RNAi and its negative control cell lines MCF-7/vector were detected by CCK-8 reagent. **Results** Compared with MCF-7 cell and MCF-7/vector cell, the expression of *RABEX-5* mRNA and protein was downregulated in MCF-7/RNAi cells. The sensitivity to epirubicin was reduced after downregulating the expression of *RABEX-5*, the 50% inhibition concentration (IC_{50}) of MCF-7/RNAi $[(3.590\ 0 \pm 0.228\ 69)\ \mu\text{g/mL}]$ was higher than that of MCF-7/Vvector $[(1.193\ 3 \pm 0.187\ 71)\ \mu\text{g/mL}]$, $P < 0.05$; while the same effect was not found in docetaxel group, the IC_{50} were $(11.162\ 7 \pm 0.210\ 26)\ \mu\text{g/mL}$ and $(10.536\ 7 \pm 0.430\ 97)\ \mu\text{g/mL}$, respectively ($P > 0.05$). **Conclusion** Downregulation of *RABEX-5* can induce chemoresistance to epirubicin in human breast cancer cell MCF-7; while its effect on sensitivity to docetaxel is not significant. This study can provide a theoretical basis for future research *RABEX-5* in the individualized treatment of breast cancer.

【Key words】 *RABEX-5* MCF-7 Epirubicin Docetaxel chemotherapy sensitivity

乳腺癌已成为女性恶性肿瘤患者死亡的首要原因^[1], 化疗是目前治疗乳腺癌的主要方法之一, 特别是蒽环类药物和紫杉类药物的出现, 大大提高了乳腺癌患者的生存率, 然而仍有部分患者对上述药物产生耐药, 从而出现复发、转移。从分子水平研究乳腺癌对化疗药物产生耐药的机制已成为当前研究的热点。RAS 相关蛋白交换因子 (RAS associated protein exchange factor, *RABEX-5*) 是近年发现的 *RAB-5* 的一个鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide

exchange factor, GEF), 在细胞囊泡融合中发挥重要的作用^[2], 与化疗药物的吸收和外排密切相关, 是潜在的耐药靶点。*RABEX-5* 在乳腺癌中已被证实存在高表达^[3], 本实验旨在通过构建 *RABEX-5* RNAi 表达载体, 下调其在人乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达, 探讨干扰前后乳腺癌细胞 MCF-7 对不同化疗药物敏感性的变化情况, 以期对乳腺癌的个体化治疗提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 Lipofectamine 2000,

* 重庆市教委基金资助项目 (No. KJ100317) 资助

[△] 通讯作者, E-mail: hongy_li@hotmail.com

Trizol 购自 Invitrogen 公司;一抗 Rabbit Anti-RABEX-5 购自 Santa-Cruz 公司;引物合成自上海捷瑞生物工程有限公司。CCK-8 购自碧云天生物科技有限公司;表柔比星购自辉瑞制药有限公司,多西他赛购自江苏恒瑞医药股份有限公司。

低温离心机(Thermo 公司),核算定量仪(NANODROP2000, Thermo 公司),倒置荧光显微镜(CTR4000B 型, IEICA 公司),凝胶成像仪(DYCP-31DN, 上海天能科技有限公司),Real-time PCR 仪(7500 型, ABI 公司)。

1.1.2 细胞株来源 人乳腺癌细胞株 MCF-7 由重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学实验室提供。4 个不同 RNA 干扰靶点的 RABEX-5 RNAi 腺病毒载体(RNAi1、RNAi2、RNAi3、RNAi4)及 1 个含无基因同源性序列的阴性对照载体(RABEX-5 NC)由本课题组前期成功构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞于 37℃、50 mL/L CO₂ 条件下,饱和湿度的培养箱(Thermo 公司)中无菌培养。培养液为含 100 mL/L 胎牛血清(Gibco 公司)的 RPMI 1640 细胞培养基。为保持 MCF-7/RNAi 及 MCF-7/vector 细胞筛选的稳定性,在其培养液中加入维持浓度的嘌呤霉素。细胞传代时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化。

1.2.2 RABEX-5 RNAi 慢病毒表达载体感染 MCF-7 及稳定株的筛选 以每孔 1.6×10^5 个的细胞量,接种 MCF-7 细胞至 24 孔板,37℃,50 mL/L CO₂ 条件下过夜培养(12~20 h)。待细胞生长到 70%~80% 融合度时感染病毒。按照病毒加药量(μL)=(细胞数 $\times$ MOI 值/病毒原液滴度) $\times 10^3$ 计算出每孔所加的病毒量,去除旧的培养液,每孔加入含 16 μL 病毒的培养液并加入 polybrene(终浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$)。病毒感染 24 h 后换培养液,感染 72 h 后拍荧光照片,分析感染效率以此选择最佳感染条件筛选稳定株。每隔 1 d 换用含 puromycin 的新的培养液进行稳定株的筛选,待抗性细胞长满以后,转入 10 cm² 细胞培养瓶培养(细胞培养时继续加入维持剂量的 puromycin)。收获细胞,进行后续实验采用 Real-time PCR 方法检测不同 RNA 干扰靶点(RNAi 1~4)慢病毒载体的干扰(敲减)效率。实验结果采用标准曲线分析法进行分析。通过筛选,选择敲减效率最高的 RABEX-5 RNAi3 腺病毒载体进行转染,获得感染空载体的阴性对照组稳定株(NC 组)及感染 RNA 干扰靶点 RABEX-5 RNAi3

腺病毒载体的目的组稳定株(KD 组)。

1.2.3 Real-time PCR 检测干扰后 RABEX-5 mRNA 的表达 收获细胞后,分别取 KD 组、NC 组及 MCF-7 细胞各 1×10^6 ,利用 Trizol 法提取总 RNA,测定 RNA 纯度、浓度及完整性后,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,合成相应的 cDNA。参照 Real-time PCR 试剂盒说明书,配制 PCR 反应液,进行 Real-time PCR 反应,采用两步法 PCR 扩增标准程序进行扩增。

引物序列: RABEX-5 上游引物, 5'-TTGGACAGATGGAATTGCAA-3';下游引物, 5'-GTTGCAGTGGTGGAGGAAGT-3'。反应条件:预变性:95℃ 30 s $\times$ 1 cycle;PCR 反应:95℃ 5 s, 60℃ 34 s $\times$ 40 cycles。

反应结束后,确认 Real-time PCR 的扩增曲线和熔解曲线,并制作 PCR 定量的标准曲线。观察 RABEX-5 在 mRNA 水平的沉默效应。

1.2.4 Western blot 方法检测干扰后 RABEX-5 蛋白的表达水平 收集各组细胞后,提取总蛋白并测定浓度。95℃水浴 5 min 变性,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后,将蛋白转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,加一抗(兔抗人 RABEX-5 抗体,1:800;鼠抗人 β -actin 抗体,1:1000)4℃孵育过夜,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,洗膜后加二抗(辣根过氧化物酶标记,1:3000)37℃孵育 1 h,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,电化学发光(ECL)发光法检测表达,比较 KD 组、NC 组及 MCF-7 细胞 RABEX-5 蛋白表达差异。

1.2.5 体外药敏实验 通过 CCK-8 方法检测 MCF-7/RNAi 和 MCF-7/vector 细胞对表柔比星和多西他赛的敏感性。取对数生长期的 MCF-7/RNAi 和 MCF-7/vector 细胞,以 5000 个/孔接种至 96 孔板,每孔 100 μL ,37℃、50 mL/L CO₂ 条件下,饱和湿度的培养箱中无菌培养。待细胞贴壁后(4~6 h)给药,每个浓度设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱内继续培养 1 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A_{450})值。按公式分别计算不同药物浓度下各组细胞的生存率:生存率=(实验组 A_{450} 值/对照组 A_{450} 值) $\times 100\%$,并分别计算表柔比星和多西他赛对细胞生长的抑制率和半数致死浓度(IC₅₀)。

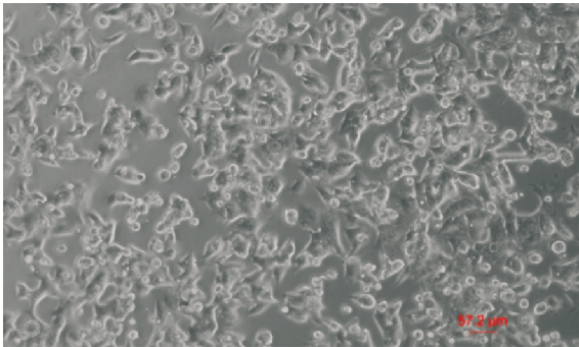
1.2.6 统计学方法 比较两组的差异采用独立样本的 t 检验,双侧检验;三组间数据的两两比较采用方差分析的 SNK 检验;Real-time PCR 结果分析采

用定量数值分析 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的分析方法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染 MCF-7 细胞的最佳感染条件

通过筛靶实验,当 $MOI=10$ 时,慢病毒载体感染 MCF-7 细胞的效率为 80%,为最佳的感染条件。



根据最佳感染条件, *RABEX-5* RNAi1 ~ 4 和 *RABEX-5* NC 慢病毒载体分别感染 MCF-7 细胞。72 h 后荧光显微镜下观察感染效果,可见 80% 以上的细胞有绿色荧光存在(图 1)。

2.2 感染 *RABEX-5* RNAi 后稳定株 *RABEX-5* mRNA 和蛋白的表达

MCF-7 细胞稳定感染后,采用 Real-time PCR

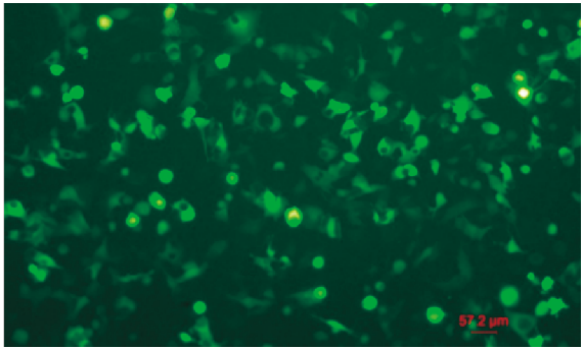


图 1 慢病毒载体 RNAi3 感染 MCF-7 细胞($MOI=10, \times 100$)

Fig 1 Infected MCF-7 cells with RNAi3 recombinant virus ($MOI=10, \times 100$)

和 Western blot 方法分别检测 *RABEX-5* mRNA 和蛋白的表达情况。Real time PCR 结果显示: MCF-7 细胞与 NC 组比较, *RABEX-5* mRNA 的表达差异无统计学意义;而相对于 NC 组,感染 *RABEX-5* RNAi3 后, KD 组 *RABEX-5* mRNA 的表达降低,敲减效率达到 75% 以上(表 1),为 4 个靶点中最有效的靶点(RNAi1、RNAi2、RNAi4 的敲减效率分别为 30%、56%、60%)。

表 1 *RABEX-5* mRNA 和蛋白在各组中的表达

Table 1 The expression of *RABEX-5* mRNA and protein in different groups

Group	mRNA	Protein
MCF-7	1.160 7±0.090 2	1.358 2±0.009 9
NC	1.252 7±0.046 2 [#]	1.232 3±0.384 3 [#]
KD	0.252 6±0.041 8	0.429 3±0.126 4

[#] $P<0.05$, vs. KD group

Western blot 结果显示: MCF-7 细胞与 NC 组相比, *RABEX-5* 蛋白表达差异无统计学意义;而感染 *RABEX-5* RNAi3 后, *RABEX-5* 蛋白表达水平显著降低,结果与 Real-time PCR 结果一致(表 1, 图 2)。

2.3 *RABEX-5* 表达下调对各组药敏感性的影响

CCK-8 法分别观察各组细胞对表柔比星和多西他赛的敏感性差异,药物剂量-生存率曲线(图 3, 图 4)结果显示:随着药物浓度的增加各组细胞的生存率降低;与 NC 组相比, MCF-7 细胞感染 *RABEX-5* RNAi3 慢病毒载体后,对表柔比星的敏

感性降低, KD 组的 IC_{50} 值高于 NC 组 $[(3.590 0 \pm 0.228 69) \mu g/mL$ vs. $(1.193 3 \pm 0.187 71) \mu g/mL]$, 差异有统计学意义($P<0.05$);而两组细胞对多西他赛的敏感性没有发生变化, KD 组和 NC 组的 IC_{50} 值分别为 $(11.162 7 \pm 0.210 26) \mu g/mL$ 、 $(10.536 7 \pm 0.430 97) \mu g/mL$, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

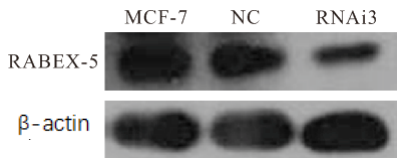


图 2 Western blot 检测 *RABEX-5* 蛋白在各组细胞中的表达

Fig 2 Detection of *RABEX-5* protein expression in different samples with Western blot

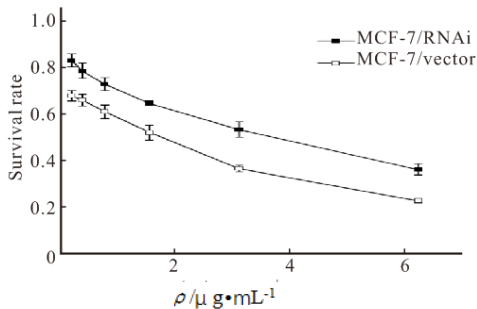


图 3 *RABEX-5* 下调降低了 MCF-7 细胞对表柔比星的敏感性

Fig 3 Downregulation of *RABEX-5* induced chemoresistance to epirubicin in human breast cancer cell MCF-7

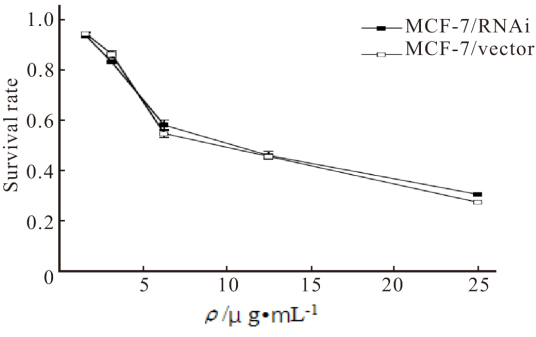


图 4 RABEX-5 下调未影响 MCF-7 细胞对多西他赛的敏感性
Fig 4 The effect of RABEX-5 downregulation on chemosensitivity to docetaxel was not significant

3 讨论

RABEX-5 最初是由 Horiuchi 等鉴定出来,定位于细胞质内的一个 GEF,含有 492 个氨基酸残基,由 6 个主要的结构域组成^[4]。RABEX-5 作为主要的鸟苷酸交换蛋白可以与 RABAPTIN-5 形成复合物后发挥激活 RAB-5 的功能并参与调节细胞吞噬过程中的囊泡融合等作用^[2]。RABEX-5 表达的异常可能导致 RAB-5 介导的胞吞过程中囊泡融合的障碍,从而导致细胞吞噬障碍^[5]。Nimmrich 等^[6]的研究发现,RABEX-5 在结肠癌细胞系 SW480 中高表达,而本课题组前期的研究也发现在人乳腺癌组织中 RABEX-5 的表达明显高于癌旁组织及良性病变组织,并且 RABEX-5 的表达与肿瘤的大小及腋窝淋巴结的转移呈正相关,提示 RABEX-5 不仅作为一个癌基因影响了肿瘤的发生及进展,而且也可能参与了肿瘤的侵袭和转移^[3]。RABEX-5 表达异常可以引起细胞吞噬功能障碍,但是,这种功能障碍是否会影响化疗药物对肿瘤细胞的作用,目前尚未见报道。

肿瘤耐药的产生机制是一个复杂的过程,涉及到肿瘤细胞多种信号分子的表达失调以及肿瘤内药物代谢的异常等^[7-11]。本研究发现,下调 RABEX-5 在 MCF-7 细胞中的表达后,MCF-7 细胞表现出了对蒽环类药物表柔比星的化疗抵抗。因此推测,下调 RABEX-5 在肿瘤细胞中的表达后,可能会引起肿瘤细胞对蒽环类药物的吸收障碍或者外排作用增加。虽然下调 RABEX-5 在 MCF-7 细胞中的表达可以表现出对蒽环类药物的化疗抵抗,但是这种效应并没有在紫杉类药物中得以体现,而对紫杉类药物依旧敏感。不同化疗药物在 RABEX-5 低表达的乳腺癌细胞中表现出了不同的作用,这种细胞水平

上的疗效的差异,是对乳腺癌的个体化治疗的一个重要提示;对于 RABEX-5 低表达的乳腺癌患者,可以选择以紫杉类药物为主的化疗方案,而尽量避免以蒽环类药物为主的化疗方案。但是,这一结论目前尚未得到临床研究验证。因此,仍需进一步研究,特别进行相关的临床研究,对上述结论进行验证和支持。

综合上述研究发现:虽然 RABEX-5 的表达与肿瘤发生及转移相关,但是下调其表达后,乳腺癌细胞表现出了对蒽环类药物的化疗抵抗,而对紫杉类药物依旧敏感,提示 RABEX-5 可以作为一个潜在的指示分子,为乳腺癌的个体化治疗提供指导。但是,RABEX-5 是否可以作为指示化疗敏感性的标记物,指导临床化疗实践,仍需进一步研究,特别是得到临床研究的支持。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. CA Cancer J Clin,2011;61(2):69-90.
- 2 Kalesnikoff J, Rios EJ, Chen CC, *et al.* RabGEF1 regulates stem cell factor/c-Kit-mediated signaling events and biological responses in mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A,2006;103(8):2659-2664.
- 3 王颖建, 厉红元, 李 焰等.RABEX-5 和 RAB5 在乳腺癌中的表达及意义. 四川大学学报(医学版),2011;42(2):185-189.
- 4 Horiuchi H, Lippe R, McBride HM, *et al.* A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. Cell, 1997;90(6):1149-1159.
- 5 Rubino M, Miaczynska M, Lippe R, *et al.* Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. J Biol Chem,2000;275(6):3745-3748.
- 6 Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, *et al.* Seven genes that are differentially transcribed in colorectal tumor cell lines. Cancer Lett,2000;160(1):37-43.
- 7 Xu AM, Huang PH. Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. Cancer Res,2010;70(10):3857-3860.
- 8 Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, *et al.* The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks smallcell lung cancer growth *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res,2009;69(22):8645-8651.
- 9 Kilbey A, Terry A, Jenkins A, *et al.* Runx regulation of sphingolipid metabolism and survival signaling. Cancer Res, 2010;70(14):5860-5869.
- 10 Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, *et al.* RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. Cancer Res, 2008;68(19):7975-7984.
- 11 Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science,2009;324(5933):1457-1461.

(2013-04-12 收稿,2013-07-22 修回)
编辑 汤 洁