

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.011.html>

干扰 AKAP12 调控 G1/S 期促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖

梁瑞鹏¹ 程倩¹ 陆春花² 李可³ 于恒恒² 徐彬² 袁顺杰² 刘维薇⁴ 林清¹

摘要 目的 研究干扰 A 型激酶锚定蛋白 12(AKAP12) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖能力的影响,并初步探讨其机制。方法 采用携带干扰 AKAP12 核苷酸序列(shRNA-AKAP12)、空白对照(shRNA-NC)的慢病毒转染乳腺癌 MCF-7 细胞。Western blot 检测转染后细胞 AKAP12 蛋白表达;CCK-8 实验、克隆形成检测增殖能力;Western blot 检测细胞周期相关蛋白激酶抑制蛋白(p21、p27)以及细胞周期进展蛋白 CyclinD1 表达。结果 与 shRNA-NC 细胞相比较,shRNA-AKAP12 细胞 AKAP12 蛋白表达量减少,CCK-8 实验以及克隆形成结果显示,shRNA-AKAP12 细胞增殖能力明显增强($P < 0.0001$ 、 $P < 0.001$)与 shRNA-NC 细胞相比,shRNA-AKAP12 细胞周期相关蛋白激酶抑制蛋白(p21、p27)表达下调,而细胞周期进展蛋白 CyclinD1 表达上调。结论 研究表明干扰 AKAP12 基因可增加 MCF-7 细胞增殖能力,干扰 AKAP12 表达加快 MCF-7 细胞 G1/S 期转换,对于雌激素受体阳性乳腺癌临床治疗和预后评估有一定价值。

关键词 A 型激酶锚定蛋白 12; 乳腺癌; 细胞周期

中图分类号 R 730

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1041-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.011

2020-04-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81572061)

作者单位: ¹安徽理工大学医学院 淮南 232000

同济大学第十人民医院² 肿瘤放射治疗科、³ 检验科、⁴ 中心实验室,上海 200072

作者简介: 梁瑞鹏,男,硕士研究生;

林清,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: linqing.linda@163.com

乳腺癌是女性最常诊断的恶性肿瘤之一,近年来无论是发病率还是致死率均高居首位^[1]。众所周知,乳腺癌是一组高度异质性疾病,雌激素受体(estrogen receptor; ER)阳性乳腺癌约占所有乳腺癌 70%,在乳腺癌患者占有较大比例。A 型激酶锚定蛋白 12(A kinase-anchored protein 12; AKAP12)是胞内大分子支架蛋白与维持正常组织结构功能完整^[2]及肿瘤细胞增殖、侵袭转移^[3]等过程密切相关。AKAP12 最早被用来评价重症肌无力预后的抗原,随后研究^[4]发现在 src 基因、ras 基因等原癌基因转化的成纤维细胞中 AKAP12 表达明显下调,文献^[5]报道,与正常组织相比,AKAP12 在多种肿瘤中表达下调,如实体肿瘤肺癌、结直肠癌^[3]、肝癌^[6],血液肿瘤如幼年髓单核细胞白血病^[7],在肿瘤细胞重新表达 AKAP12 抑制肿瘤细胞增殖、迁移侵袭,而干扰 AKAP12 则增加肿瘤细胞增殖、迁移侵袭能力,因此 AKAP12 被认为是潜在的抑癌基因。但 AKAP12 与乳腺癌生物学功能是否有关尚未阐明,AKAP12 是否参与乳腺癌的发生发展有待于研究。该研究通过干扰 ER 阳性乳腺癌 MCF-7 细胞中 AKAP12 表达来观察其对 ER 阳性 MCF-7 细胞增殖、周期机制的影响,初步探讨 AKAP12 在 ER 阳性乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-

female C57BL/6 mouse to generate gene mutation in Exon3. We got both 13bp-deletion and 19bp-deletion GRK2^{+/-} mice according to genotyping performed through PCR and gene sequencing. Since GRK2 homozygous are embryonic lethality, we cross-bred 19 bp-deletion F0 GRK2^{+/-} mice with C57BL/6 to obtain stable 19bp-deletion F1 generation of GRK2^{+/-} mice for propagation and the following experiments. **Results** The genotype of GRK2^{+/-} mouse was steady with significant lower body weight compared with C57BL/6 mouse at the same age. Western blot results showed that almost half of the GRK2 protein expression was reduced in immune organs like spleen and thymus as well as other tissues. **Conclusion** This GRK2 targeted genetically engineered mouse model will provide a promising approach for understanding the role of GRK2 in the development of diverse organs and cells as well as its pathogenic role and therapeutic implications in chronic diseases.

Key words G protein-coupled receptor kinase 2; CRISPR/Cas9; genetically engineered mice; genotyping

MB-231、MDA-MB-468 和 SK-BR-3 以及乳腺正常上皮细胞 MCF-10A 均购自中国科学院上海细胞库; 特异性干扰 AKAP12 基因的慢病毒和阴性对照慢病毒购自吉凯公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 hyclone 公司; CCK-8 试剂购自上海诺维赞生物科技公司; RIPA 裂解液(强)、蛋白酶抑制剂 PMSF 购自江苏碧云天生物技术研究所; 鼠抗人 AKAP12 单克隆抗体购自 abcam 公司; β -actin 鼠抗人单克隆抗体购自 proteintech 公司; 兔抗人 P21 抗体、兔抗人 P27 抗体以及鼠抗人 CyclinD1 抗体均购自 proteintech 公司。

1.2 细胞培养及转染 所有细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养基培养, 培养于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱; 接种细胞于六孔板待贴壁稳定, 更换 1 ml 不含双抗的 DMEM 完全培养基和 40 μ l 病毒感染增强液(购自上海吉凯基因化学技术有限公司), 按照 1 : 10 的 MOI 值加入病毒液, 24 h 后更换正常培养基继续培养, 48 h 后荧光显微镜下看细胞转染效率(成功转染细胞标记绿色荧光), 更换含有 5 μ g/ml 嘌呤霉素的完全培养基进行药物筛选。

1.3 Western blot 检测蛋白量 收集细胞添加适量细胞裂解液(按照 1 : 100 加入蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 10 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液使用 BCA 法测定总蛋白浓度, 按照 20 μ g 上样检测, 80 V 恒压电泳, 电泳结束后采用 200 mA 恒流低温转膜至 NC 膜(AKAP12 转膜时间为 2 h), 室温 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 一抗 4 °C 孵育 12 h, PBST 溶液清洗 3 次, 每次 5 min, 二抗室温孵育 1 h, PBST 溶液清洗 3 次, 每次 5 min。扫膜读取条带并测量条带灰度值。

1.4 CCK-8 细胞增殖实验 取各组处于对数生长期细胞消化计数, 按照 4 000 个细胞/孔的密度铺设于 96 孔板中, 分别在 24、48、72 h 检测结果。添加 CCK8 试剂后 2 h 后于酶标仪 450 nm 波长处读值。

1.5 细胞平板克隆形成实验 取各组处于对数生长期细胞消化计数, 按照 2 000 个每孔铺设于 6 孔板中, 继续培养两周后, 70% 酒精固定, 0.1% 结晶紫染色晾干镜下计数, 大于 50 个细胞计数一个克隆。

1.6 生信网站分析乳腺癌中 AKAP12 表达与生存曲线 使用乳腺癌数据网站 Miner v4.1 (bcGenExMiner v4.1) 评估不同分子亚型乳腺癌中 AKAP12 表达情况和生存曲线分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件和 Graph-

Pad Prism 6 对数据进行统计分析、制图, 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间采用单因素方差分析, 两组比较采用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分子亚型乳腺癌 AKAP12 表达情况及乳腺癌 Luminal A 型高表达 AKAP12 生存愈后较好

使用乳腺癌信息网站(<http://bcgenex.centregaud-ucheau.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php?js=1>) 分析 AKAP12 表达量与乳腺癌分子分型、预后相关信息^[8] 结果显示如图 1, 各分子亚型乳腺癌 AKAP12 mRNA 水平明显均低于正常组织 ($P < 0.0001$), 且 AKAP12 在各个乳腺癌亚型的相对表达情况在不同

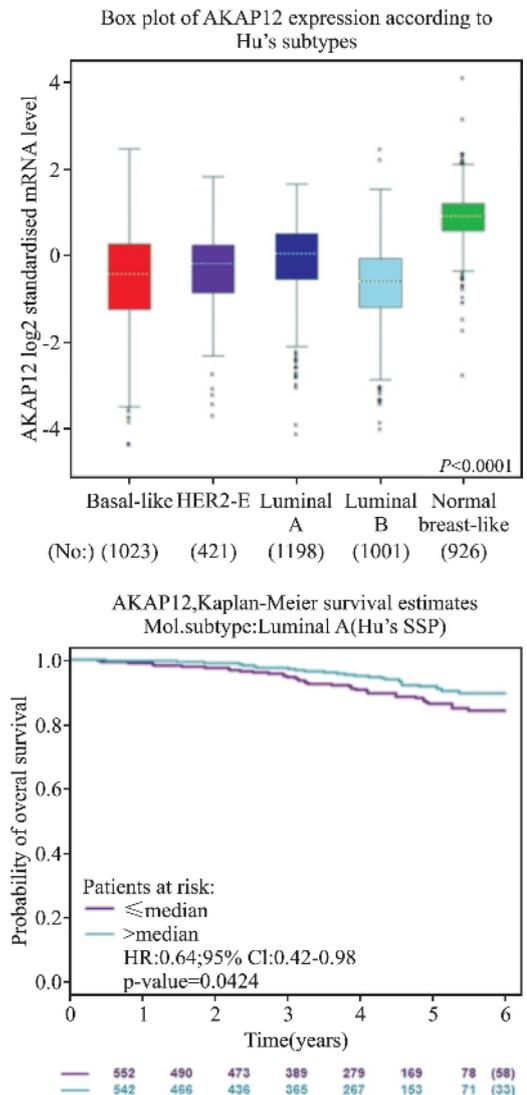


图 1 不同分子分型乳腺癌 AKAP12 表达情况及乳腺癌 Luminal A 型高表达 AKAP12 生存愈后较好

分子分型存在差异;生存曲线显示,Luminal A型乳腺癌患者较高的AKAP12代表较好的生存愈后($P < 0.05$)。

2.2 AKAP12蛋白在各个分子分型乳腺癌细胞以及正常乳腺上皮细胞MCF-10A的表达水平 选取实验室常用各个分子分型乳腺癌细胞株以及人正常乳腺上皮细胞MCF-10A,检测其AKAP12表达情况结果显示(图2),与正常乳腺上皮细胞株MCF-10A比较,各分子亚型乳腺癌细胞株明显低表达AKAP12,差异均具有统计学意义($P < 0.001$, F 值分别是19.00、16.01、13.61和21.89),提示AKAP12的丢失或与乳腺癌发生相关。

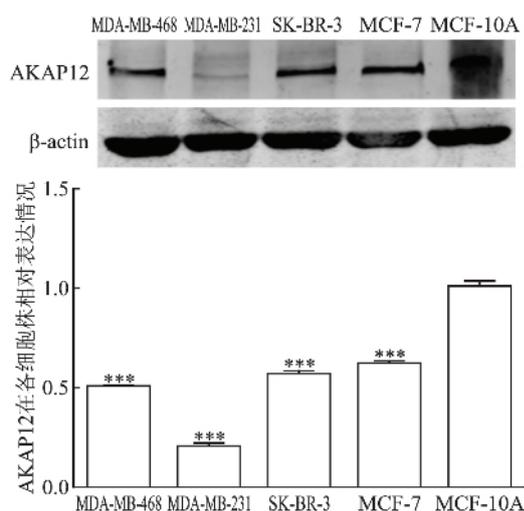


图2 AKAP12在各个分子亚型乳腺癌细胞以及正常乳腺上皮细胞MCF-10A的表达水平与乳腺正常上皮细胞比较:*** $P < 0.001$

2.3 慢病毒转染MCF-7细胞及Western blot检测AKAP12蛋白表达 细胞经慢病毒转染后,Western blot检测AKAP12蛋白水平的变化,检测结果显示(图3),与空载体对照组比较,shRNA-AKAP12细胞AKAP12蛋白表达下调,两组细胞AKAP12蛋白表达差异具有统计学意义($P < 0.0001$, $F = 1.857$),表明细胞转染成功,可进行后续实验研究。

2.4 AKAP12对MCF-7细胞增殖能力的影响 采用CCK-8增殖检测和细胞克隆形成实验评价AKAP12对MCF-7增殖能力的影响,72h内CCK-8检测实验结果显示(图4A),与对照组相比,shRNA-AKAP12细胞表现出增殖速率加快,差异具有统计学意义($P < 0.0001$, $F = 1.778$);细胞克隆形成是检验单个细胞长成一个独立集落的能力,反映细胞增殖活力和持续增殖的能力,克隆形成结果显示(图4B、4C),MCF-7细胞干扰AKAP12表达后表现

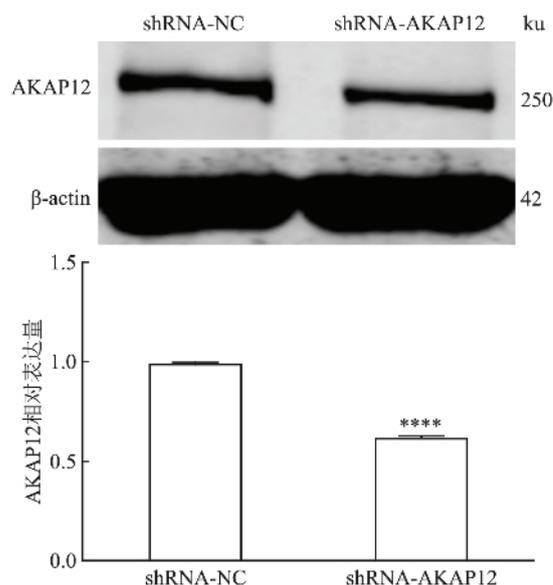


图3 干扰AKAP12基因后MCF-7细胞AKAP12蛋白的表达水平与shRNA-NC细胞比较:**** $P < 0.0001$

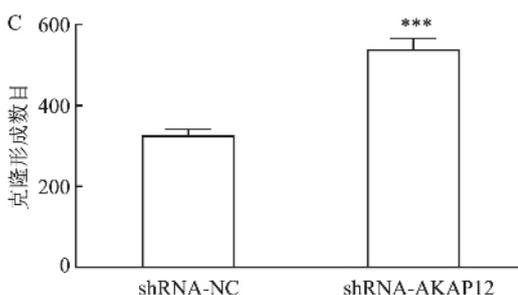
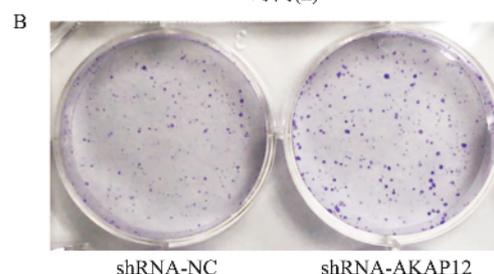
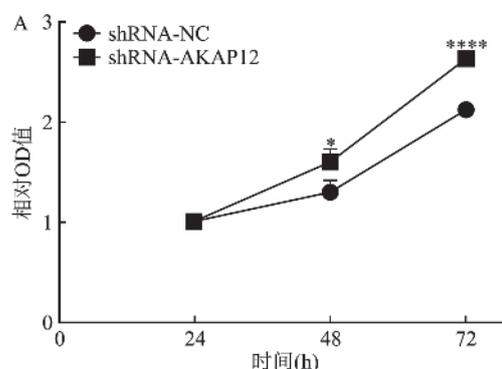


图4 干扰AKAP12增强MCF-7细胞增殖能力

A: CCK-8实验显示干扰AKAP12表达细胞较空载体转染细胞增殖速率快;B、C:干扰AKAP12表达细胞克隆形成数目明显大于空载体转染细胞;与shRNA-NC细胞比较:* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$

为细胞克隆形成多于相应空载体组 ,且克隆形成体积明显大于空载体组 ,差异具有统计学意义($P < 0.001$, $F = 2.011$)。 综上 ,干扰 AKAP12 表达促进 MCF-7 细胞的增殖能力 ,AKAP12 或是其潜在的抑癌基因。

2.5 干扰 AKAP12 表达促进 MCF-7 细胞 G1/S 期进展 干扰 MCF-7 细胞 AKAP12 表达后 ,Western blot 检测调控 G1/S 期转换相关蛋白表达变化 检测结果显示抑制 G1/S 期转换的 P27、P21 蛋白表达下调 ,尤其是 P21 蛋白 ,然而促进 G1/S 期进展的 CyclinD1 蛋白则表达上调。 干扰 AKAP12 表达后增加 MCF-7 细胞的增殖能力 ,加快肿瘤细胞周期(G1/S 期) 进展是其机制之一。 见图 5。

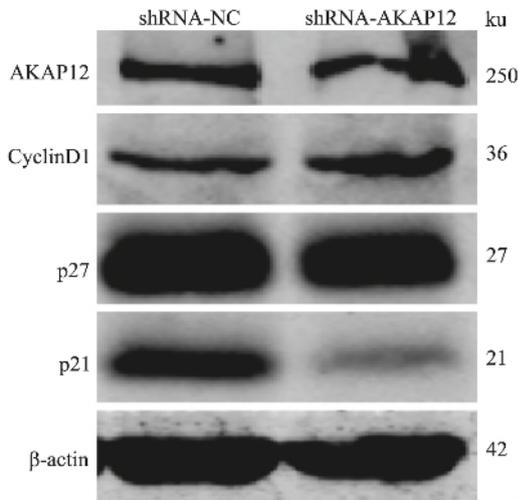


图 5 干扰 AKAP12 表达促进 MCF-7 细胞 G1/S 期进展

3 讨论

肿瘤细胞持续增殖和凋亡受阻是其恶性行为及难于治疗的原因之一。 AKAP12 与肿瘤细胞增殖关系密切: 过表达 miR-403 通过抑制 AKAP12 表达增加 PKC 活性进而增加端粒酶活性促进肝癌细胞增殖^[6] 抑制 miR-403 通过增加 AKAP12 表达进而可阻止端粒酶逆转录酶的核转位和磷酸化 ,降低肝细胞肝癌 HCC 细胞中的端粒酶活性从而抑制增殖并促进 HCC 细胞的凋亡 ,非小细胞肺癌中 TFAP2C 通过诱导致癌 miR-403 的过表达阻断 AKAP12 介导的细胞周期蛋白 D1 抑制进而促进肺癌细胞增殖^[5] ,纤维肉瘤 HT1080 细胞^[9] 研究中 AKAP12 诱导细胞凋亡与 Bcl-2 的表达降低和 Bax 的表达增加有关 ,并且降低 Cyclin D1 表达水平且阻滞其核定位 ,引起细胞周期阻滞。 Liu et al^[10] 在结直肠癌 Lovo 细胞重

表达 AKAP12 发现明显抑制细胞生长并显著增加 cleaved-caspase3 水平诱导细胞凋亡。

综上所述 ,AKAP12 抑制肿瘤细胞增殖或通过控制细胞周期进展和促进凋亡相关蛋白表达。 但也有研究通过临床结直肠癌病例样本免疫组化染色并没有发现 AKAP12 与 Bcl-2 及 P53 存在统计学差异^[11] ,以及三阴性乳腺癌细胞 Hs578T 细胞中敲除 AKAP12 诱导细胞迁移能力增加^[12] ,但不影响细胞增殖凋亡。 最初在大鼠 MAT-LyLu(MLL) 前列腺癌细胞中证实了 AKAP12 具有转移抑制潜能 ,AKAP12 重表达对原发部位肿瘤的生长影响甚微 ,但是明显减少了肉眼可见肺部转移 ,提示 AKAP12 发挥抑癌基因作用抑制肿瘤细胞增殖和迁移侵袭。 但在黑色素瘤的研究中^[13] ,相较于正常皮肤 ,原发灶及转移样本均具有较高水平 AKAP12 变体 2 表达 降低 AKAP12 v2 通过减少蛋白激酶 A(PKA) 调节的磷酸化减少黑色素瘤的迁移和侵袭 ,研究结果支持 AKAP12 v2 及其支架功能的存在对于体外转移性黑色素瘤细胞迁移和侵袭是必要的 ,且较高表达 AKAP12 与不良生存相关 ,在对胃癌研究中^[14] ,基于 GEO 数据库分析 AKAP12 在胃癌组织中的表达及临床意义 ,研究认为高表达 AKAP12 预示着不良的愈后 ,这也提示 AKAP12 作为胞内大分子支架蛋白通过锚定不同信号分子在肿瘤中存在复杂机制有待研究。

AKAP12 在乳腺癌的研究鲜有报道。 本研究显示 AKAP12 在肿瘤细胞中表达下调 ,提示正常乳腺组织中丢失 AKAP12 或与乳腺癌发生有关; ER 阳性 MCF-7 细胞相对于其他分子分型细胞株高表达 AKAP12 ,这与 Soh et al^[12] 研究存在差异 ,Soh et al^[12] 认为三阴性乳腺癌细胞 AKAP12 表达高于其他分子亚型。 研究通过在 MCF-7 细胞干扰 AKAP12 基因后观察细胞增殖、迁移侵袭等表型变化 ,实验结果显示 AKAP12 与 MCF-7 细胞增殖关系密切 ,干扰 AKAP12 则增强 MCF-7 细胞增殖能力 ,同时 ,研究也进行了 Transwell 实验检验 MCF-7 亲本株细胞及干扰 AKAP12 后细胞侵袭能力的变化 ,但未见到细胞穿过基底膜(数据未列出) 。 综上 ,本研究表明干扰 AKAP12 增强乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖能力 ,与 AKAP12 调控细胞周期 G1-S 期转换相关。

参考文献

[1] Bray F , Ferlay J , Soerjomataram I , et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

- for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca A Cancer J Clin* ,2018 68 (6) : 394 – 424.
- [2] Li Y , Yu Q H , Chu Y , et al. Blockage of AKAP12 accelerates angiotensin II (Ang II) -induced cardiac injury in mice by regulating the transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2018 499(2) : 128 – 35.
- [3] He P , Li K , Li S B , et al. Upregulation of AKAP12 with HDAC3. depletion suppresses the progression and migration of colorectal cancer [J]. *Int J Oncol* ,2018 52(4) : 1305 – 16.
- [4] Gelman I H. The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in. the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development [J]. *Fronti Biosci* ,2002 7: d1782 – 97.
- [5] Kang J , Kim W , Lee S , et al. TFAP2C promotes lung tumorigenesis and aggressiveness through miR-183-and miR-33a-mediated cell cycle regulation [J]. *Oncogene* ,2016 ,36(11) : 1585 – 96.
- [6] Xia W , Ni J , Zhuang J , et al. MiR-103 regulates hepatocellular carcinoma growth by targeting AKAP12 [J]. *Int J Biochem Cell Biol* ,2016 ,71: 1 – 11.
- [7] Wilhelm T , Lipka D B , Witte T , et al. Epigenetic silencing of AKAP12 in juvenile myelomonocytic leukemia [J]. *Epigenetics* , 2016 ,11(2) : 110 – 9.
- [8] Jezequel P , Frenel J S , Campion L , et al. bc-GenExMiner 3. 0: new mining module computes breast cancer gene expression correlation analyses [J]. *Database* ,2013 2013: 1 – 9.
- [9] Yoon D K , Jeong C H , Jun H O , et al. AKAP12 induces apoptotic cell death in human fibrosarcoma cells by regulating CDKI-cyclin D1 and caspase-3 activity [J]. *Cancer Lett* ,2007 ,254(1) : 111 – 8.
- [10] Liu W , Guan M , Hu T , et al. Re-Expression of AKAP12. Inhibits progression and metastasis potential of colorectal carcinoma *in vivo* and *in vitro* [J]. *PLoS one* ,2011 6(8) : e24015.
- [11] Suren D , Yildirim M , Alikanoglu A S , et al. Lack of relation of AKAP12 with p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* ,2014 ,15(8) : 3415 – 8.
- [12] Soh R Y Z , Lim J P , Samy R P , et al. A-kinase anchor protein 12(AKAP12) inhibits cell migration in breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol* ,2018 ,105(3) : 364 – 70.
- [13] Finger E C , Castellini L , Rankin E B , et al. Hypoxic induction of AKAP12 variant 2 shifts PKA-mediated protein phosphorylation to enhance migration and metastasis of melanoma cells [J]. *Proc Natl Acad of Sci U S A* 2015 ,112(14) : 4441 – 6.
- [14] 周西汉 ,徐嘉利. 基于 GEO 数据库分析 AKAP12 在胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志* ,2019 24(7) : 28 – 33.

Interfering with AKAP12 promotes proliferation of breast cancer MCF-7 cells by regulating G1/S phase

Liang Ruipeng¹ , Cheng Qian¹ , Lu Chunhua² , et al

(¹Medical College Anhui University of Science and Technology , Huainan 232000;

²Dept of Radiation Oncology , Tenth People's Hospital , Tongji University , Shanghai 200072)

Abstract Objective To investigate the effect of interference with AKAP12 on the proliferation ability of human breast cancer MCF-7 cells and to explore its mechanism. **Methods** MCF-7 cells were exogenously transfected lenti-virus with shRNA-AKAP12 and shRNA-NC , respectively. Western blot was conducted to examine the expression of AKAP12 protein in transfected cells. The proliferation ability of transfected cells were measured by CCK-8 assay and cell plate cloning assay. Western blot was used to detect the protein expression levels of cyclin-dependent kinase(CDK) inhibitors(p21 , p27) and cell cycle progression-related CyclinD1. **Results** Compared to shRNA-NC cells , the expression of AKAP12 protein in shRNA-AKAP12 cells decreased. CCK-8 assay and colony formation assay showed that the cell proliferation ability of shRNA-AKAP12 cells increased significantly($P < 0.0001$, $P < 0.001$). Compared to the shRNA-NC cells , the expression of the cyclin-dependent kinase(CDK) inhibitors(p21 , p27) were down-regulated in the shRNA-AKAP12 cells , while the cell cycle progression protein(CyclinD1) was up-regulated. **Conclusion** The study indicated that interference with AKAP12 gene could increase the proliferation ability of MCF-7 cells. It accelerated the G1-S phase transition of MCF-7 cells after interference with AKAP12 gene. Thus it is available to clinical treatment and prognosis evaluation of estrogen receptor-positive breast cancer.

Key words A kinase-anchored protein 12; breast cancer; cell cycle