

PGRMC1 参与调控乳腺癌细胞增殖及化疗敏感度的实验

纪术峰¹, 杨华峰², 吴爱国¹

Progesterone Receptor Membrane Component-1 Regulates Proliferation and Drug Sensitivity of Breast Cancer Cells

Ji Shufeng¹, Yang Huafeng², Wu Aiguo¹

1. Department of General Surgery, Zuhui Hospital Affiliated of Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; 2. Department of Breast Surgery, Women Children's Hospital Affiliated of Ningbo Medical University

Corresponding Author: Wu Aiguo, E-mail: wagjiaoshou@163.com

Abstract: Objective To study on the roles of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) to inhibit proliferation and improve drug sensitivity in breast cancer cell. **Methods** siRNA targeting PGRMC1 was designed and chemically synthesized, and then transfected into high invasive breast cancer cell line MDA-MB-231 and low invasive cell line MCF-7 by lipofectin2000. The mRNA and protein of PGRMC1 were detected by QRT-PCR and Western blot method respectively. The siRNA-GFP was used as positive control, and 0.9% saline as blank control. The drug sensitivity of DTX was detected by CCK8 method before and after transfection siRNA- PGRMC1. Breast cancer cell lines were treated by 50% of IC_{50} DTX, and detected cell cycle, apoptotic ratio and ROS level after stained by PI, annexin V and DCFH-DA respectively by FCM. After stained by JC-1, the membrane potential of mitochondrion was identified by immunofluorescence method. **Results** siRNA was able to significantly inhibit more than 70% PGRMC1 expression of mRNA and protein in both high and low invasive breast cell lines. The proliferation of cancer cells was decreased and drug sensitivity was increased through PGRMC1 inhibiting. After inhibition of PGRMC1, the cell was arrested on stage G₂. Comparing with control group, the higher apoptosis ratio and ROS level and lower membrane potential were observed in treatment group. **Conclusion** PGRMC1 played an important role in regulating the viability and drug resistance of breast cancer.

Key words: Progesterone receptor membrane component-1; Breast cancer; siRNA

摘要: 目的 探讨孕激素膜受体 1 (progesterone receptor membrane component-1, PGRMC1) 是否参与乳腺癌细胞增殖及化疗药物敏感度的调控, 为乳腺癌的化疗提供参考依据。方法 设计合成以 PGRMC1 为靶标的 siRNA1、2, 用 lipofectin2000 转染人乳腺癌高转移细胞株 MDA-MB-231 (ER-, PR-) 和低转移细胞株 MCF-7 (ER+, PR+), QRT-PCR 检测转染 siRNAs 后 PGRMC1 基因 mRNA 水平变化, Western blot 法检测蛋白表达变化, 以 siRNA-GFP 为阳性对照, 未处理组为空白对照。CCK8 法检测转染前后 DTX 敏感度。应用 1/2 的 IC_{50} DTX 作用转染组与对照组, 流式细胞仪检测各组细胞周期变化, Annexin V/PI 阳性细胞百分比, 对比各组细胞凋亡率、死亡率, 双氢二氯荧光黄染色阳性率判定各组细胞内 ROS 水平。JC-1 染色后, 免疫荧光显微镜下观察各组细胞线粒体膜电位变化。结果 以 PGRMC1 为靶标设计的 siRNA1、2 对该基因 mRNA 及蛋白表达显著抑制在 70% 以上, 细胞增殖受抑, 对化疗药物敏感度增高, 与非转染组相比 G₂ 期细胞比例明显增加, 凋亡细胞比率明显增加, 细胞内 ROS 水平也随之升高, 线粒体膜电位下调。结论 PGRMC1 参与了乳腺癌细胞增殖及化疗敏感度的调控。

关键词: 孕激素膜受体 1 (PGRMC1); 乳腺癌; siRNA

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0123-04

0 引言

雌、孕激素与特异性受体结合后, 在子宫、卵巢、乳腺乃至脑^[1] 的分化发育中起到重要调控作用, 以往研究认为雌、孕激素受体为胞内受体, 近年研究发现, 许多组织细胞膜、线粒体及突触膜上有孕激素的特异结合位点, 被称为孕激素膜受体^[2-3]。这些受体不仅可与孕激素结合, 还可与雌激素结合。乳腺癌是女性当中最常见的肿瘤, 50%~80% 的乳腺癌中发现了经典的雌激素受体 ER- α 。ER- α 阳性与良好

收稿日期: 2011-04-07; 修回日期: 2011-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072176); 广东省自然科学基金资助项目 (04105743)

作者单位: 1. 510282 广州, 南方医科大学珠江医院普外科;
2. 宁波大学医学院附属妇女儿童医院乳腺外科

通信作者: 吴爱国, E-mail: wagjiaoshou@163.com

作者简介: 纪术峰 (1967-), 男, 博士在读, 主治医师, 主要从事乳腺肿瘤的基础与临床工作

的预后相关,包括细胞增殖率降低,肿瘤分化的组织学证据,以及是否进行抗雌激素内分泌治疗,但 ER- α 的状态同时也预示着恶性转移位点。ER- α 阳性的肿瘤早已被证实发生骨、软骨及生殖系统转移的可能性很大,而 ER- α 阴性的肿瘤则发生脑肝转移更为普遍。Flototto 等^[4] 基于 ER- α 阳性和阴性的恶性肿瘤的差异蛋白组学分析,意外地发现在 ER- α 阴性的这些乳腺癌中细胞色素 b5 区域蛋白 PGRMC1 的大量的磷酸化亚群。PGRMC1 可能与激素相关肿瘤乳腺癌的恶性增殖及化疗敏感度密切相关,是乳腺癌发生发展相关的新生生物指标^[5],本课题设计合成 2 个 siRNA—PGRMC1, 转染高转移和低转移乳腺癌细胞株, 观察瘤细胞增殖及其化疗药物敏感度的变化, 探索 PGRMC1 参与乳腺癌发生、发展的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Liprofectamine 2000、Trizol、PI、Annexin-V、DCFH-DA 购自 Invitrogen 公司; QRT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; PGRMC1 羊抗人抗体购自 Abcam 公司, 兔抗羊二抗购自博士德公司; 蛋白裂解液购自威佳公司。

1.2 方法

1.2.1 PGRMC1 特异性 siRNA 基因敲除靶序列的设计、合成与转染 人 PGRMC1(NM_006667), 针对其序列 299(siRNA1)、404(siRNA2)核苷酸为起始位点设计合成 2 个 siRNA 和 1 个 GFP 对照 siRNA。取人乳腺癌高转移细胞株 MDA-MB-231 和低转移细胞株 MCF-7 复苏后, 用无酚红含 10% FBS 的 DMEM, 于 5%CO₂、37℃ 条件下培养至对生长期, 设空白对照组、对照 siRNA 组 (siRNA-GFP)、siRNA 1/2-PGRMC1 组。无血清 DMEM 培养 6 h 后, 按 4×10^5 /ml 细胞接种 6 孔培养板, Liprofectamine 2000 转染 siRNA。继续培养 6 h 后用无钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 3 次, 再用无酚红含 10% FBS 继续培养。空白对照组不给予任何处理。

1.2.2 siRNA 特异性抑制 PGRMC1 的检测 (1) QRT-PCR 测定 PGRMC1 mRNA 的表达。Trizol 抽提转染后计时 12 h 的各组细胞总 mRNA, 紫外分光光度计测总 RNA 浓度, PGRMC1 上游引物: 5'-CAACGGCAAGGTGTCGAT-3', 下游引物: 5'-TCCAGCAAAGACCCATACG-3' (由上海生工合成)。扩增条件为: 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 35 个循环 (罗氏公司 LightCycler 480 仪器)。(2) Western blot 测定 PGRMC1 蛋白表达。转染后计时 48 h 的各组细胞以裂解液冰上裂解, 100℃ 沸水浴 10 min, 离心收集上清液。蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 一抗稀释后, 4℃ 下孵育 PVDF 膜过夜。TBS/T 缓冲液漂洗后与二抗室温下孵育 1 h, TBST 缓冲液漂洗、曝光、显影、定影。

1.3 CCK8 法检测 siRNA 抑制 PGRMC1 后乳腺癌细胞增殖和药物敏感度

MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞按 2×10^5 /L 的浓度接种于 96 孔板, 分组为空白对照组, siRNA 1/2 组, DTX 组(浓度分别为 50, 100, 250, 500 nM), siRNAs + DTX。每组设 3 个复孔。在 37℃ 孵育 24、48、72 h 后, 加入 CCK8 10 μ l, 4 h 后在酶标仪上读取 OD 值, 检测波长 450 nm, 细胞存活率 = (试验组 OD/空白组 OD)/(对照组 OD/空白组 OD) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪法检测乳腺癌细胞周期

空白对照组, 1/2 的 IC₅₀ DTX, siRNAs + 1/2 的 IC₅₀ DTX 于转染 12 h 后, 各组细胞以 70% 冻乙醇固定, 以 PI 溶液 (50 μ g/ml PI, 0.1% Triton X-100, 0.1 mmol/L EDTA 和 50 μ g/ml RNase A in PBS) 染色 15 min, 流式细胞仪分析 DNA 含量。

1.5 流式细胞仪法检测细胞凋亡率、死亡率、胞内 ROS 和线粒体膜电位

取组同上, 转染 24 h 后, 细胞以 1 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞。用 400 μ l Hepes (10 mmol/L Hepes, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L Ca²⁺) 缓冲液重悬, 2 000 r/min 离心 5 min, 分为 2 份, 一份以 150 μ l Hepes 缓冲液重悬, 加入 5 μ l Annexin-V-FITC/PI, 室温避光 15 min; 一份加入 5 μ l 双氢二氯荧光黄, 均室温避光 30 min, 离心弃上清液, PBS 洗 2 次, 加入 300 μ l Hepes 缓冲液, 上流式细胞仪分析。

1.6 免疫荧光显微镜检测细胞线粒体膜电位

取组同上, 转染 24 h 后, 弃去培养上清液, PBS 洗 3 次, JC-1 染色, 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗 3 次, Hoechst 33258 复染核, PBS 洗 3 次, 抗荧光淬灭封片剂封固, Leica 显微镜下摄片。

1.7 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.1 软件包进行统计学处理。统计方法采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 抑制乳腺癌细胞 PGRMC1 基因 mRNA 表达

siRNA1、2 均可显著抑制高、低转移的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7, 转染 siRNA1、2 12 h 后, PGRMC1 基因 mRNA 表达显著抑制 70% 以上 (*P* 均 < 0.001), 而 siRNA-GFP 和转染试剂对 PGRMC1 基因 mRNA 表达与对照组相比差异无统计学意义 (*P* = 0.2565, 0.2514; *P* = 0.2355, 0.3008), 见图 1。

2.2 siRNA 抑制乳腺癌细胞 PGRMC1 基因蛋白表达

转染后 12 h 后, siRNA1/2 均可显著抑制人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 PGRMC1 蛋白表达, Western blot 结果显示 PGRMC1 蛋白条带明显减弱, 灰度分析显示为对照组 10% 以下, 为检测 siRNA 转染效率, 特将部分 siRNA 用绿色荧光标记,

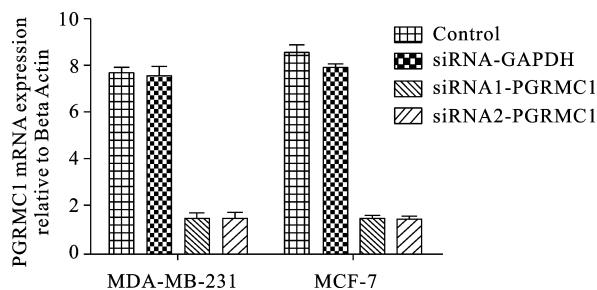
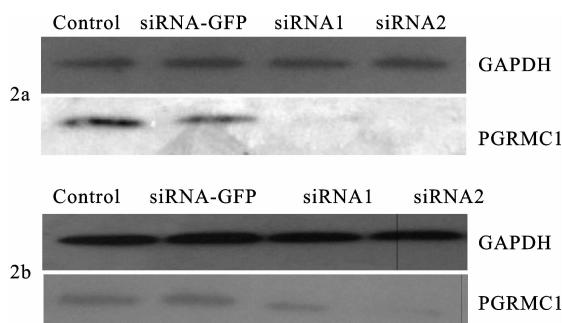


图 1 QRT-PCR 检测 siRNAs 抑制乳腺癌细胞 PGRMC1 基因 mRNA 表达

Figure 1 The mRNA level of PGRMC1 in breast cancer cells after transfected siRNA detected by QRT-PCR method

荧光显微镜观察转染效率在 70% 以上, 转染 siRNA1/2 的细胞几乎没有 CY3 标记 PGRMC 蛋白的表达, 而 siRNA-GFP 对 PGRMC-1 蛋白表达与对照组相比差异无统计学意义, 见图 2。



The first line shows the 66-kDa bands of GAPDH in MCF-7(2a) and MDA-MB-231(2b), the second blot illustrates the levels PGRMC1 in different groups

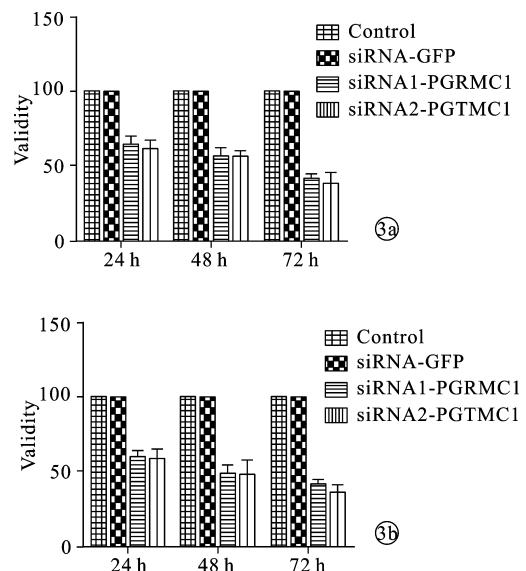
图 2 Western blot 检测 siRNAs 抑制乳腺癌细胞 PGRMC1 基因蛋白表达

Figure 2 The protein level of PGRMC1 in different groups of breast cancer cells after transfected siRNA detected by Western blot

2.3 siRNAs-PGRMC1 抑制人乳腺癌细胞增殖, 提高瘤细胞药物敏感度

siRNA1/2-PGRMC1 对乳腺癌细胞增殖起显著抑制作用, 转染后 24、48 和 72 h 细胞存活率 siRNA1 与对照组相比, 采用 *t* 检验分析, MDA-MB-231 细胞的 *t* 值分别为 11.54, 14.03 和 18.89, MCF-7 细胞的 *t* 值分别为 12.33, 14.21 和 19.41; siRNA2 与对照组相比, 采用 *t* 检验分析, MDA-MB-231 细胞的 *t* 值分别为 10.92, 13.54 和 18.48, MCF-7 细胞的 *t* 值分别为 11.71, 13.77 和 18.99, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.001)。siRNA-GFP 对瘤细胞增殖轻微抑制, 和对照组相比差异无统计学意义 ($P = 0.3083$), 考虑为转染试剂所致。转染 siRNA-PGRMC1 后瘤细胞对化疗药物敏感度显著提高 (P 均 <0.001), 而 siRNA-GFP 组则与单纯化疗差异无统计学意义 ($P = 0.4208$), 见图 3。

2.4 siRNAs-PGRMC1 对乳腺癌细胞周期、凋亡率及胞内 ROS 的影响



3a: MDA-MB-231 cell; 3b: MCF-7 cell

图 3 siRNAs 抑制 PGRMC1 对乳腺癌细胞增殖及药敏的影响

Figure 3 Validity and drug sensitivity of breast cancer cell lines after transfecting PGRMC1-siRNA

与对照组相比, siRNA1、2 抑制 PGRMC1 活性, 联合 1/2 IC_{50} DTX, MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 G_2 期细胞百分比明显增多, *t* 值分别为 7.018、6.392 和 7.43、6.702; 与 1/2 IC_{50} DTX 相比, *t* 值分别 4.359, 3.732 和 5.251, 4.523; 与 siRNA-GFP 组相比, *t* 值分别 8.272, 7.645 和 7.244, 6.516, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.001)。同时两株细胞凋亡率、死亡率及细胞内 ROS 水平均升高。与对照组凋亡率相比, *t* 值分别为 8.552, 9.375 和 10.281, 9.578; 与 1/2 IC_{50} DTX 相比, *t* 值分别 4.968, 5.818 和 6.305, 5.509; 与 siRNA-GFP 组相比, *t* 值分别为 7.201, 8.024 和 9.578, 8.807, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。与对照组死亡率相比, *t* 值分别为 13.686, 12.145 和 11.181, 13.258; 与 1/2 IC_{50} DTX 相比, *t* 值分别 7.444, 4.507 和 4.264, 5.09; 与 siRNA-GFP 组相比, *t* 值分别 12.883, 11.342 和 9.47, 11.55, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。与对照组 ROS 阳性率相比, *t* 值分别为 30.63, 32.41 和 31.08, 29.59; 与 1/2 IC_{50} DTX 相比, *t* 值分别 11.77, 13.07 和 11.68, 10.59; 与 siRNA-GFP 组相比, *t* 值分别 28.82, 30.59 和 29.78, 28.29, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 1、2。

表 1 siRNAs-PGRMC1 对乳腺癌细胞周期的影响

Table 1 Influence of siRNAs-PGRMC1 on cell cycle of breast cancer cell lines

Groups	G_2 (%)	
	MDA-MB-231	MCF-7
Control	13.41 \pm 2.05	13.85 \pm 1.44
1/2 IC_{50} DTX	18.12 \pm 2.53*	17.71 \pm 2.88*
siRNA-GFP	11.19 \pm 1.85	14.18 \pm 2.62
siRNA1-PGRMC1 + 1/2 IC_{50} DTX	25.84 \pm 1.97*	27.01 \pm 2.27*
siRNA2-PGRMC1 + 1/2 IC_{50} DTX	24.73 \pm 2.19*	25.72 \pm 1.41*

Note: *: $P < 0.05$, vs. control group

表 2 siRNAs-PRGMC1 对乳腺癌细胞凋亡率、死亡率及胞内 ROS 的影响
Table 2 Influence of siRNAs-PRGMC1 on ROS level, apoptosis and death ratio of breast cancer cell

Groups	Cell apoptosis rate(%)		Cell death rate(%)		Intracellular ROS(%)	
	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7
Control	1.31 ± 0.09	1.47 ± 0.06	0.733 ± 0.101	1.057 ± 0.103	17.07 ± 2.51	17.63 ± 1.48
1/2 IC ₅₀ DTX	6.59 ± 1.56*	7.38 ± 1.29	4.51 ± 0.32*	5.09 ± 0.101	42.81 ± 2.06*	44.38 ± 1.46*
siRNA-GFP	3.22 ± 0.45	2.47 ± 0.35	1.183 ± 0.121	2.013 ± 0.132	20.26 ± 2.39	19.92 ± 3.18
siRNA1-PRGMC1 + 1/2 IC ₅₀ DTX	13.39 ± 1.79*	16.01 ± 2.21	8.4 ± 0.797*	7.32 ± 0.936	71.11 ± 2.22*	72.46 ± 4.48*
siRNA2-PRGMC1 + 1/2 IC ₅₀ DTX	14.56 ± 2.02*	14.91 ± 3.38*	7.537 ± 1.262*	8.483 ± 0.778*	74.23 ± 3.21*	69.83 ± 2.79*

Note: * : $P < 0.05$, vs. control group

2.5 siRNAs-PRGMC1 对乳腺癌细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位正常时 JC-1 染色后呈红色,当线粒体受损后红色荧光变弱,出现绿色荧光变化。在 siRNA1、2 抑制 PGRMC1 并联合 1/2 IC₅₀ DTX 后,细胞线粒体受损显著,呈红色的线粒体明显减少,见图 4。

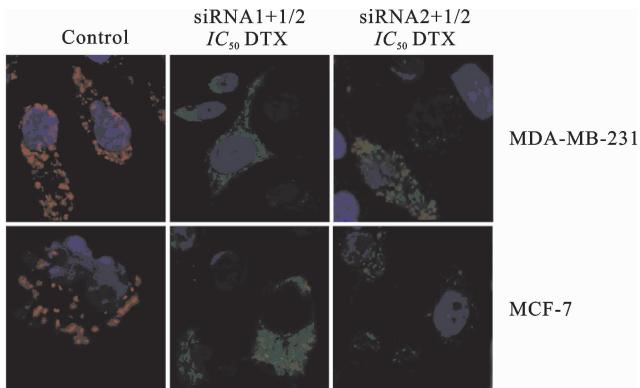


图 4 siRNAs-PRGMC1 对乳腺癌细胞线粒体膜电位的影响
Figure 4 Influence of siRNAs-PRGMC1 on membrane potential of mitochondria in breast cancer cell lines

3 讨论

PGRMC1 即 Hpr6 分子,可与血红素 Heme1 分子结合,与细胞色素 b5 同源,在多种实体瘤高表达,其突变将提高细胞对 DNA 烷化剂的敏感度,抑制固醇类激素物质的生物合成。本研究以 PGRMC1 为靶点,设计合成 siRNA1/2,特异性沉默高转移乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞和低转移的 MCF-7 细胞该基因的表达,观察瘤细胞生物活性的变化,探讨 PGRMC1 的表达在维持乳腺癌细胞恶性增殖及化疗敏感度中所起的作用。Friberg 等^[6]通过化疗诱导 PGRMC1 的表达。Peluso 等^[7]研究显示 PGRMC1/Hpr6 跨膜区的 C 末端参与孕激素抗正常颗粒细胞凋亡的调控,而 PGRMC1 与纤溶酶原激活物抑制剂 RNA 结合蛋白 1 (PAIRBP1) 结合位点也在其 C 末端的 70–130aa 的位置,敲除 PGRMC1 表达后孕激素抗卵巢癌细胞凋亡效应丧失。体内外 PGRMC1 均与卵巢癌细胞对顺铂的敏感度密切相关,敲除 PGRMC1 基因后,瘤细胞体外培养生长缓慢,荷瘤裸鼠瘤体明显小于对照组。Mansouri 等^[8]用顺铂治疗卵巢癌结果显示

PGRMC1 受抑后,癌细胞对化疗药物敏感度显著提高。为研究 PGRMC1 在乳腺癌细胞发生、发展及调节药物敏感度的机制,本研究设计合成了 2 条特异性的 siRNA 抑制该基因表达,RT-PCR 及 Western blot 结果均显示,siRNAs 可特异性抑制 PGRMC1 基因 mRNA 和蛋白的表达。本实验结果与上述研究一致表明:诱导 PGRMC1 表达下调可抑制高转移和低转移乳腺癌细胞增殖,使 G₂期细胞显著升高,细胞凋亡胞内 ROS 水平升高,提高化疗药物对瘤细胞的损伤。PGRMC1 既是孕激素受体也是雌激素受体之一,通过类固醇信号转导其重要作用,同时作为 P450 激活和药物结合方面具有多功能的靶蛋白,以把 PGRMC1 作为靶标拮抗并联合化疗可能成为乳腺癌治疗的新途径。

参考文献:

- [1] Liu B, Arbogast LA. Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus[J]. J Neuroendocrinol, 2009, 21(12):993-1000.
- [2] Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007, 105(1-5):16-36.
- [3] Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, et al. Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration[J]. Ann Oncol, 2007, 18(3):409-420.
- [4] Flöttotto T, Niederacher D, Hohmann D, et al. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER) alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 88(2):131-142.
- [5] Neubauer H, Clare SE, Wozny W, et al. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(5):R85.
- [6] Friberg PA, Larsson DG, Billig H. Dominant role of nuclear progesterone receptor in the control of rat periovulatory granulosa cell apoptosis[J]. Biol Reprod, 2009, 80(6):1160-1167.
- [7] Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, et al. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action[J]. Endocrinology, 2006, 147(6):3133-3140.
- [8] Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, et al. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(23):3776-3783.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]