

·基础研究·

## RNAi沉默 PELP1/MNAR 基因对子宫内膜癌细胞增殖和细胞周期的作用

万 璟, 李小毛\*

(中山大学附属第三医院妇科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】构建脯氨酸-谷氨酸-亮氨酸富集蛋白 1(PELP1)基因慢病毒表达载体,研究沉默 PELP1/雌激素受体非基因组活性辅助调节因子(PELP1/MNAR)基因表达对子宫内膜癌细胞增殖和周期的作用及机制。【方法】构建合成靶向 PELP1/MNAR RNAi 慢病毒表达载体,并转染子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,Real-time PCR 和 western blot 检测 PELP1/MNAR mRNA 和蛋白水平的表达。使用普通培养基和加入 E2 的培养基培养各组细胞,MTT 检测各组细胞增殖情况;流式细胞仪检测细胞生长周期情况;Western blot 检测 ER 下游靶基因 c-fos, cyclin D1 的蛋白表达水平。【结果】成功构建合成靶向 PELP1/MNAR RNAi 慢病毒表达载体,转染子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,转染后 PELP1/MNAR mRNA 的表达和蛋白的表达分别下降 86%和 65%( $P < 0.05$ )。转染后 Ishikawa 细胞与对照组相比增殖抑制( $P < 0.05$ ),细胞周期 G0/G1 期细胞比例增加,S 期细胞比例减少( $P < 0.05$ )。加入雌激素后,三组细胞的生长速度加快,细胞 S 期的比例增加,转染组增殖抑制明显( $P < 0.05$ ),S 期比例降低( $P < 0.05$ )。转染组 ER 下游基因 c-fos, cyclin-D1 蛋白水平均显著降低( $P < 0.05$ )。【结论】在子宫内膜癌细胞中沉默 PELP1/MNAR 的表达能抑制细胞生长、使细胞阻滞在 G1 期,下调 ER 靶基因蛋白表达,PELP1/MNAR 有望成为子宫内膜癌治疗的潜在靶点。

**关键词:**子宫内膜癌;RNA 干扰;脯氨酸-谷氨酸-亮氨酸富集蛋白 1/雌激素受体非基因组活性辅助调节因子;慢病毒  
**中图分类号:**R73      **文献标志码:**A      **文章编号:**1672-3554(2013)06-0811-08

## Effects of Silencing PELP1/MNAR Expression by RNA Interference on Proliferation and Cell Cycle of Endometrial Cancer Cells

WAN Jing, LI Xiao-mao\*

(Department of Gynecology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sun University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:**【Objective】 To establish a lentiviral vector based RNA interference expression system targeting PELP1/MNAR to obtain stable transcript knockdown, and investigate the effect of down-regulation of PELP1/ MNAR on proliferation, cell cycle of endometrial cancer cell with or without estrogen stimulation, and its mechanisms. 【Methods】 The shRNA oligonucleotides targeting to PELP1/MNAR gene were synthesized and cloned to generate shRNA lentivirus expressive vectors. Endometrial cancer cell Ishikawa was transfected, and gene silencing effect was determined by real-time PCR and Western blot analysis on the level of mRNA and protein. With or without E2 stimulation, the proliferation rate of transfected Ishikawa cells were detected by MTT; cell cycle were measured by flow cytometry. The protein expression of the ER target gene c-fos, cyclin D1 were detected by Western blot. 【Result】 The RNAi lentivirus expression vector targeting PELP1/MNAR sequence were constructed and the endometrial cancer cell Ishikawa was transfected successfully. Compared with control, the levels of PELP1/MNAR mRNA and protein in transfected Ishikawa cells were significantly reduced by 86 and 65%, respectively ( $P < 0.05$ ). The transfected Ishikawa cells showed a decrease in proliferation compared with the parental cells and that the effect of PELP1/MNAR down-regulation on cell proliferation was more pronounced when 17 $\beta$ -E2 was added ( $P < 0.05$ ). The results of flow cytometry showed a clear effect of transfected Ishikawa cells were arrested on the G0/G1 phase of the cells compared with the control with or without E2 treatment. Transfected Ishikawa cells were reduced sharply in S phase, accordingly ( $P < 0.05$ ). The down-regulation of PELP1/MNAR in Ishikawa cells also reduced expression of the ER target

收稿日期:2013-03-18

基金项目:国家自然科学基金(30772332);广东省医学科学基金(2012)

作者简介:万璟,博士,主治医师,E-mail:wanjing1978@163.com,\*通信作者:李小毛,教授,博士生导师,E-mail:tigerlee777@163.com

gene *c-fos*, cyclin-D1. 【Conclusion】 PELP1/MNAR down-regulation substantially reduced cell proliferation and G1-S cell cycle progression of Ishikawa cells with or without E2 stimulation. The silencing effect of PELP1/MNAR down regulate the expression of ER target gene *c-fos*, cyclin D1. PELP1/MNAR might be a potential therapeutic target for endometrial cancer.

**Key word:** endometrial carcinoma; RNA interference; PELP1/MNAR; Lenti virus

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6): 811-818]

脯氨酸-谷氨酸-亮氨酸富集蛋白 1/雌激素受体非基因组活性辅助调节因子(proline-, glutamic acid-, leucine-rich protein 1/ modulator of nongenomic activity of estrogen receptor, PELP1/MNAR) 是一种新近发现的核受体辅助活化因子, 在调节雌激素受体功能中发挥重要作用。越来越多的证据提示 PELP1/MNAR 可能是一种原癌基因, 其在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等多种激素依赖性肿瘤中均表达异常, 在激素依赖性肿瘤的发生、发展、转移中发挥的特殊作用, 可能成为内分泌依赖性肿瘤治疗的一个新靶点<sup>[1-2]</sup>。研究显示, PELP1/MNAR 在子宫内膜癌中表达明显高于绝经后子宫内膜<sup>[3]</sup>, 且其表达水平与子宫内膜癌临床病理分期有关。但其对子宫内膜癌细胞生物学行为的影响仍然未知。本课题研究采用 RNA 干扰技术, 构建靶向 PELP1/MNAR 的 shRNA 慢病毒表达载体, 并转染子宫内膜癌 Ishikawa 细胞, 在 RNA 及蛋白水平验证其沉默效应。研究 RNA 干扰沉默 PELP1/MNAR 表达后对子宫内膜癌细胞增殖、周期的影响, 并探讨其作用的机理, 对雌激素受体下游靶基因表达的影响, 旨在为子宫内膜癌发病机理的研究和治疗提供新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人子宫内膜癌细胞株 Ishikawa, HEC-1A, AN3CA 由本实验室保存。慢病毒载体 PELP1/MNAR 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及包装由长沙艾杰生物技术有限公司完成。慢病毒载体系统为 pGCSIL-GFP 慢病毒载体、pHelper1.0 载体和 pHelper2.0 载体三质粒载体系统。慢病毒载体中均含有 GFP 序列, 可表达绿色荧光蛋白。靶向 PELP1/MNAR 的序列为: 5'-GGACCAAGGTGTATGCGATAT-3', 阴性对照 (Negative Control) 病毒阴性对照病毒: 序列为: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3', 滴度为  $1 \times 10^9$  TU/mL。主要试剂:

胎牛血清、DMEM、RPMI 1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司; 17 $\beta$ -雌二醇, MTT 购自美国 SIGMA 公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit Perfect Real Time, SYBRgreen Mixture 购自日本 Takara 公司; 兔抗人 PELP1 多克隆抗体购自美国 abnova 公司, 兔抗人 MNAR 多克隆抗体购自美国 abcam 公司, 兔抗人 c-Fos 抗体, Cyclin D 抗体购自美国 CST 公司, 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自北京博奥森生物有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 santa cruz 公司, 全蛋白提取试剂盒, 2, 2'-二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自南京凯基。

### 1.2 引物设计

在 NCBI 上搜索到人相关基因的 mRNA 序列, 使用软件设计引物, 由上海英骏生物公司及大连宝生物公司合成。各基因引物序列如表 1。

表 1 各基因的引物序列  
Table 1 Primer sequences for real-time PCR

Gene	Sequences
PELP1 sense primer	5'CTCAGTAATGCACGTCTCAGTTCCA3'
antisense primer	5'GAATGCTCCGAAGCCAAGACA3'
$\beta$ -actin sense primer	5'CAGCCATGTACGTTGCTATCCAGG-3'
antisense primer	5'AGGTCCAGACGCAGGATGGCATG-3'

### 1.3 免疫细胞化学测定蛋白表达

将已消毒的载玻片置于 100 mm 培养皿中, 按  $2 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> 的细胞密度将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片, 3 d 后进行免疫细胞组织化学染色鉴定。每例标本滴加 50  $\mu$ L PELP1/MNAR 一抗, 每张切片滴加 50  $\mu$ L HRP 二抗 (Dako Envision 复合物)。DAB 显色 (避光, 镜下观察至棕色), 苏木素复染后, 树胶封片。

### 1.4 慢病毒转染

实验前保证细胞的良好生长状态, 实验前一天接种  $2 \times 10^5$  个细胞于 6 孔培养板中, 所加培养基体积为 1 mL。进行病毒感染时细胞的融合率约

为 50% ~ 60%。以 50 MOI 值加入适量病毒感染细胞, 并加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Polybrene 及无血清培养基, 感染总体积为 1 mL。实验分 3 组: Ishikawa-CON 为未感染病毒的细胞组 (Control); Ishikawa-NC 为加阴性对照病毒感染的细胞组 (Negative Control); Ishikawa-KD 为加 RNAi 靶点病毒感染的细胞组 (Knock Down)。8 ~ 12 h 以后观察细胞状态, 弃去细胞上清, 更换为新鲜含 100 mL/L 胎牛血清培养基。根据慢病毒的特点, 一般在增殖较快的细胞中病毒感染 72 ~ 96 h 后, GFP 基因表达才达到高峰。对于增殖较慢的细胞, GFP 基因表达时间还会延长。所以我们在转染第 4 ~ 5 天, 荧光显微镜观察 GFP 荧光表达情况。在转染后 5 d, 收集细胞抽提 RNA 进行 real-time PCR 检测 RNA 水平的改变, 在转染后 7 d 收集细胞蛋白进行 Western blot 检测检测蛋白水平的变化。

### 1.5 Real-time PCR 检测 PELP1RNA 表达

转染后 5 d, 用 Trizol 抽提总 RNA, 变性电泳, 测定  $A_{260}$  及  $A_{280}$  值, 调整总 RNA 浓度为 1 g/L,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。根据 PELP1 序列设计合成引物,  $\beta$ -actin 为内参(表 1)。先以总 RNA 为模板进行逆转录反应, 然后以 cDNA 为模板在 ABI 7700 荧光 PCR 仪上进行 PCR 反应, PCR 反应条件为预变性  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。PCR 扩增完毕进行熔解曲线分析, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 利用 CT 值计算各基因 mRNA 的相对量。目的基因 mRNA 相对表达量用  $2^{-\Delta\text{CT}}$  来表示 ( $\Delta\text{CT}$  为目的基因的 CT 值减去  $\beta$ -actin 的 CT 值)。

### 1.6 Western 印迹法检测蛋白表达

转染后第 7 天, 提取  $1 \times 10^6$  个细胞的蛋白, 紫外分光光度计定量蛋白。聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后, 电转法将目的蛋白条带从凝胶转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h, 分别加 PELP1, c-Fos 抗体, Cyclin D 一抗室温孵育 1 h, 冰箱过夜, TBST 洗膜 3 次, 加二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后化学发光显色, 照相, 采用 Quantity one 软件对蛋白条带灰度值进行分析, 目的蛋白的相对表达水平为目的蛋白条带密度/GAPDH 条带密度。

### 1.7 MTT 法检测细胞增殖

转染后第 5 天, 将各组细胞以  $3 \times 10^3$  个/每孔的密度接种于 96 孔板, 每组细胞再分成加药组和不加药组, 在加药组相应的孔中加入  $10^{-9}$  mol/L

$\text{E}_2$ <sup>[3]</sup>, 置  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中孵育; 继续培养 72 h, 各时间点设置 3 个复孔; 培养终止前 4 h 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 的 MTT; 继续培养 4 h 后取出, 小心吸弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 充分溶解; 选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪上吸光度(A 值), 并绘制细胞增殖曲线。

### 1.8 流式细胞仪测定细胞周期

转染后第 4 天, 将 3 组细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于六孔板, 3 组细胞再进一步分成加药和不加药组。细胞贴壁后换用无血清培养基, 饥饿 72 h 后, 不加药组更换为含 100 mL/L 胎牛血清的完全培养基, 加药组更换完全培养基并同时加入  $10^{-9}$  mol/L  $\text{E}_2$ , 继续作用 20 h。使用凯基细胞周期检测试剂盒, 按试剂盒说明书进行, 流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 实验数据用均数  $\pm$  标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 PELP1/MNAR 在子宫内膜癌细胞系中的表达

鉴于 PELP1/MNAR 是一种雌激素受体的共调节因子, 我们采用了细胞免疫化学方法检测了三株不同 ER 表达状态的子宫内膜癌细胞株中 PELP1/MNAR 的表达情况, 结果如图 1。子宫内膜癌 Ishikawa 细胞为 ER $\alpha$  阳性表达, ER $\beta$  阴性; HEC-1A 细胞为 ER $\alpha$  阴性表达, ER $\beta$  阳性; 而 AN3CA 为 ER $\alpha$  及 ER $\beta$  均阴性表达。但三株细胞中 PELP1/MNAR 均为阳性表达, 进一步观察 PELP1/MNAR 在细胞中表达的位置, 发现 PELP1 蛋白主要表达在细胞核。根据 PELP1 在子宫内膜癌不同细胞株中的表达及 ER 的表达状态, 我们发现尽管几株子宫内膜癌细胞株中 PELP1 表达丰度均符合后续 RNAi 靶点有效性验证实验的要求, 但 Ishikawa 细胞中 ER 表达水平较高, 为更好地研究雌激素和 PELP1/MNAR 在子宫内膜癌发病中的作用机制, 故后续实验选择了 Ishikawa 细胞作为研究对象。

### 2.2 RNAi 慢病毒对 Ishikawa 细胞 PELP1/MNAR 基因 RNA 和蛋白水平的沉默作用

为验证 PELP1/MNAR RNAi 在 RNA 及蛋白

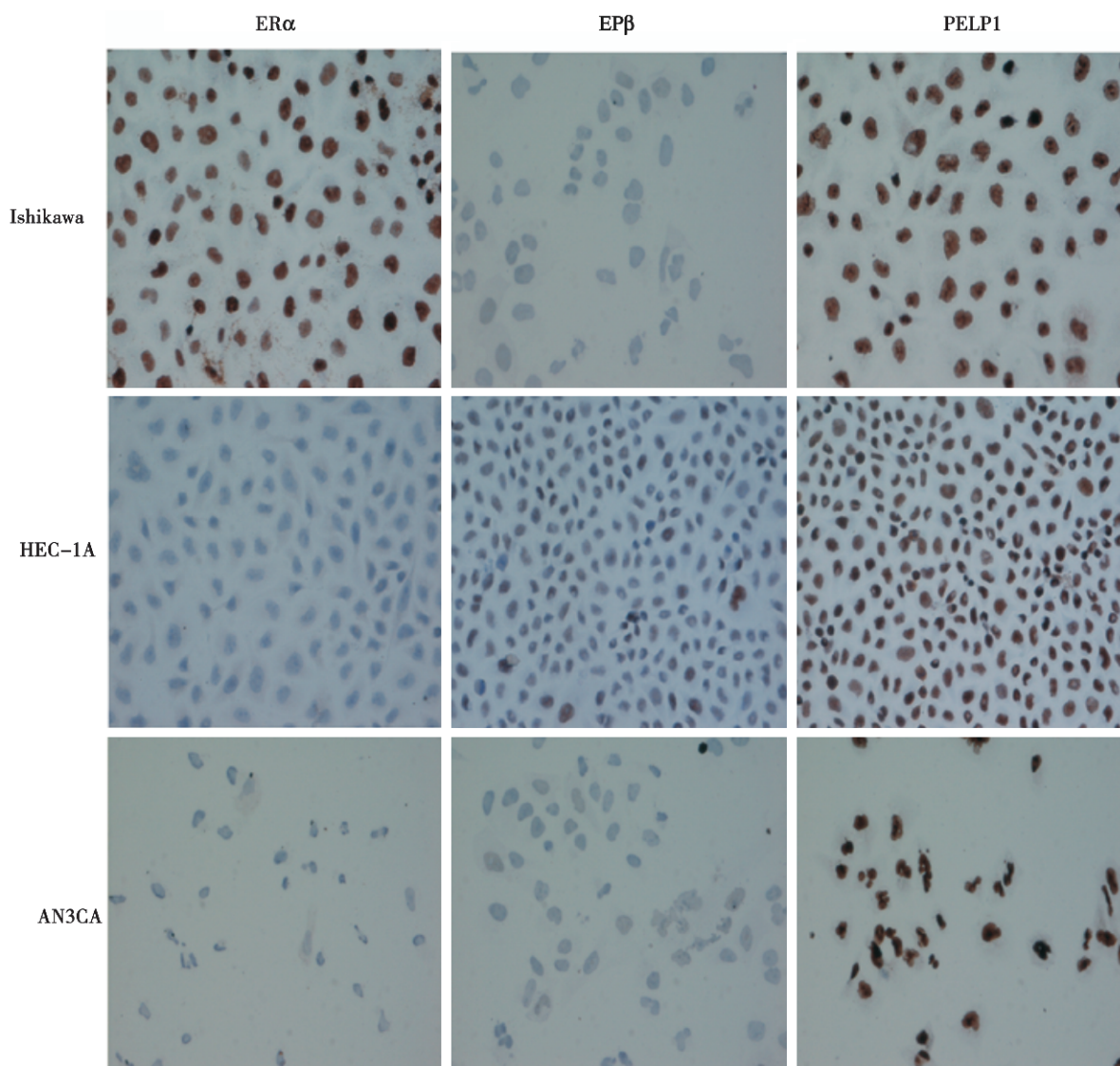


图 1 不同子宫内膜癌细胞株中 ER $\alpha$ , ER $\beta$  和 PELP1/MNAR 的共表达情况 ( $\times 400$ )

Fig.1 ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and PELP1/MNAR expression in different endometrial cancer cell lines ( $\times 400$ )

水平的沉默作用,我们以 50 MOI 的转染指数转染感染 Ishikawa 细胞 5 d 后,收集细胞提取总 RNA, real-time quantitative PCR 检测 3 种 Ishikawa 细胞中 PELP1/MNAR mRNA 的表达,以  $\beta$ -actin 作为内参。Real-time quantitative PCR 检测结果显示:相对 NC 组, KD 组 PELP1 基因沉默效率达 86%, 差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 而 Ishikawa-CON 组与 NC 组则无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

在转染 7 d 后提取各组细胞总蛋白,免疫印迹检测细胞 PELP1/MNAR 蛋白的表达,结果显示: KD 组细胞 PELP1/MNAR 蛋白表达明显降低 65%, 与 CON 组和 NC 组相比,差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.3 沉默 PELP1/MNAR 对 Ishikawa 细胞增殖的影响

慢病毒成功转染细胞后,采用 MTT 法对细胞增殖能力进行检测,我们发现 72 h 后,与 CON 组 ( $0.419 \pm 0.078$ ) 和 NC 组 ( $0.375 \pm 0.03$ ) 相比, KD 组细胞增殖发生抑制 ( $0.317 \pm 0.050$ ), 差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ ) 而 CON 组和 NC 组增殖情况未见明显差异 ( $P > 0.05$ )。加入雌激素刺激后,三组细胞的生长速度均比不加雌激素时增快 CON 组 ( $0.472 \pm 0.070$ ), NC 组 ( $0.552 \pm 0.100$ ), 但同样而 KD 组 ( $0.312 \pm 0.065$ ) 增殖速度减慢(图 4)。上述结果提示无论雌激素刺激与否,与对照相比,沉默 PELP1 都能使细胞的生长速度变慢。

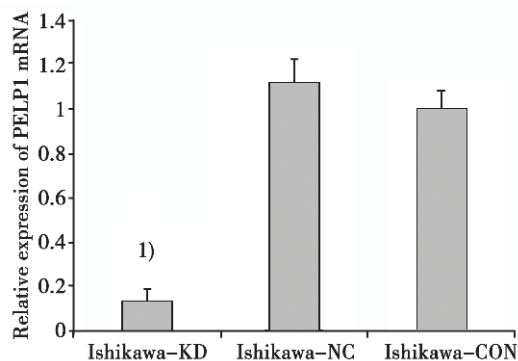


图2 RNAi 慢病毒 Ishikawa 细胞 PELP1/MNAR 基因 RNA 水平的沉默作用

Fig.2 Silencing effect of PELP1/MNAR mRNA expression in Ishikawa cells after stable transfection with PELP1/MNAR-RNAi

1)  $P < 0.05$  vs NC and CON group

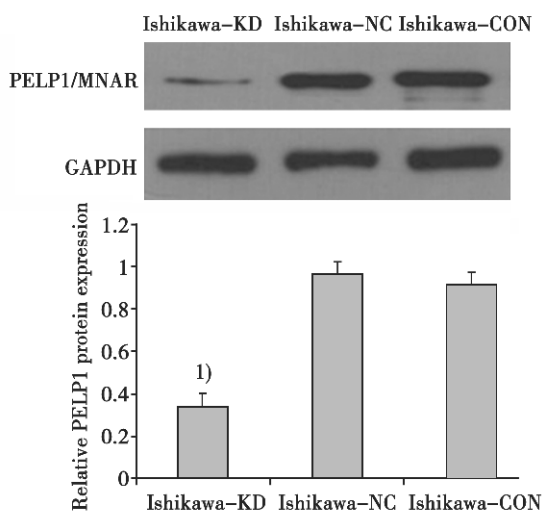


图3 RNAi 慢病毒 Ishikawa 细胞 PELP1/MNAR 基因蛋白水平的沉默作用

Fig.3 Silencing effect of PELP1/MNAR protein expression in Ishikawa cells after stable transfection with PELP1/MNAR-RNAi

1)  $P < 0.05$  vs NC and CON group

#### 2.4 沉默 PELP1/MNAR 对 Ishikawa 细胞对细胞周期的影响

慢病毒成功转染细胞后,采用流式细胞仪法对细胞周期进行检测(图5)。结果提示 CON 组和 NC 组细胞周期分布未见明显差异 ( $P > 0.05$ ),KD 组细胞周期发生改变,G0/G1 期细胞比例( $53.29 \pm 3.71$ )增加,S 期细胞比例( $26.65 \pm 1.84$ )减少,与

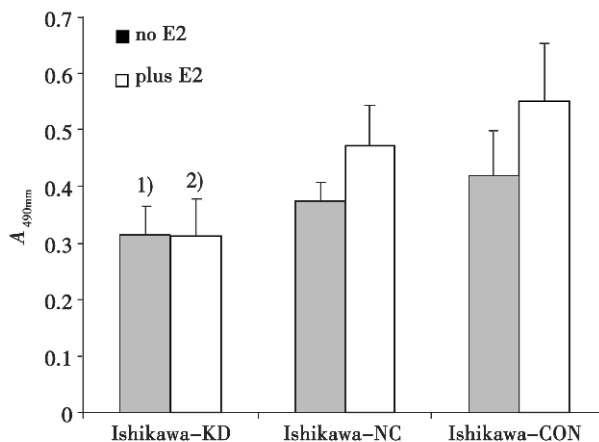


图4 MTT 法检测 3 组细胞加或不加雌激素后 72h 细胞生长情况

Fig.4 Proliferation of each group cells after 72 h with or without E2 stimulation

1)  $P < 0.05$  vs Ishikawa-NC and Ishikawa-CON (no E2), 2)  $P < 0.05$  vs Ishikawa-NC and Ishikawa-CON (Plus E2)

CON 组 ( $45.57 \pm 1.47$ )( $37.2 \pm 1.86$ )、NC 组( $45.94 \pm 2.43$ )( $34.25 \pm 2.10$ )相比,差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。加入雌激素刺激后,3 组细胞 S 期的比例均增加,但相对于 Ishikawa-CON ( $34.25 \pm 2.10$ )和 Ishikawa-NC 组 ( $42.33 \pm 2.03$ ),Ishikawa-KD 组 ( $31.17 \pm 4.01$ )细胞 S 期比例较低 ( $P < 0.05$ )。以上结果说明,沉默 PELP1 的表达能抑制细胞从 G1 期向 S 期的转换,从而抑制细胞的增殖,这种抑制作用不依赖于雌激素刺激。

#### 2.5 对 ER 下游靶基因表达水平的影响

我们检测了沉默 PELP1/MNAR 水平后对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 ER 受体下游基因水平表达的影响,在转染后第 7 天,提取细胞总蛋白,采用 WB 方法检测 ER 下游基因 c-fos, Cyclin D1 的蛋白表达水平,发现与 Ishikawa-CON 和 Ishikawa-NC 细胞相比,Ishikawa-KD 细胞中 c-fos, Cyclin D1 水平下降 ( $P < 0.05$ ,图 6)。

### 3 讨论

子宫内膜癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率在世界范围内逐渐上升<sup>[4]</sup>。尽管经典理论一直认为雌激素和雌激素受体介导的信号通路是子宫内膜癌发病的重要因素,但其具体调节的分子机制仍然未知。核受体共调节因子在调

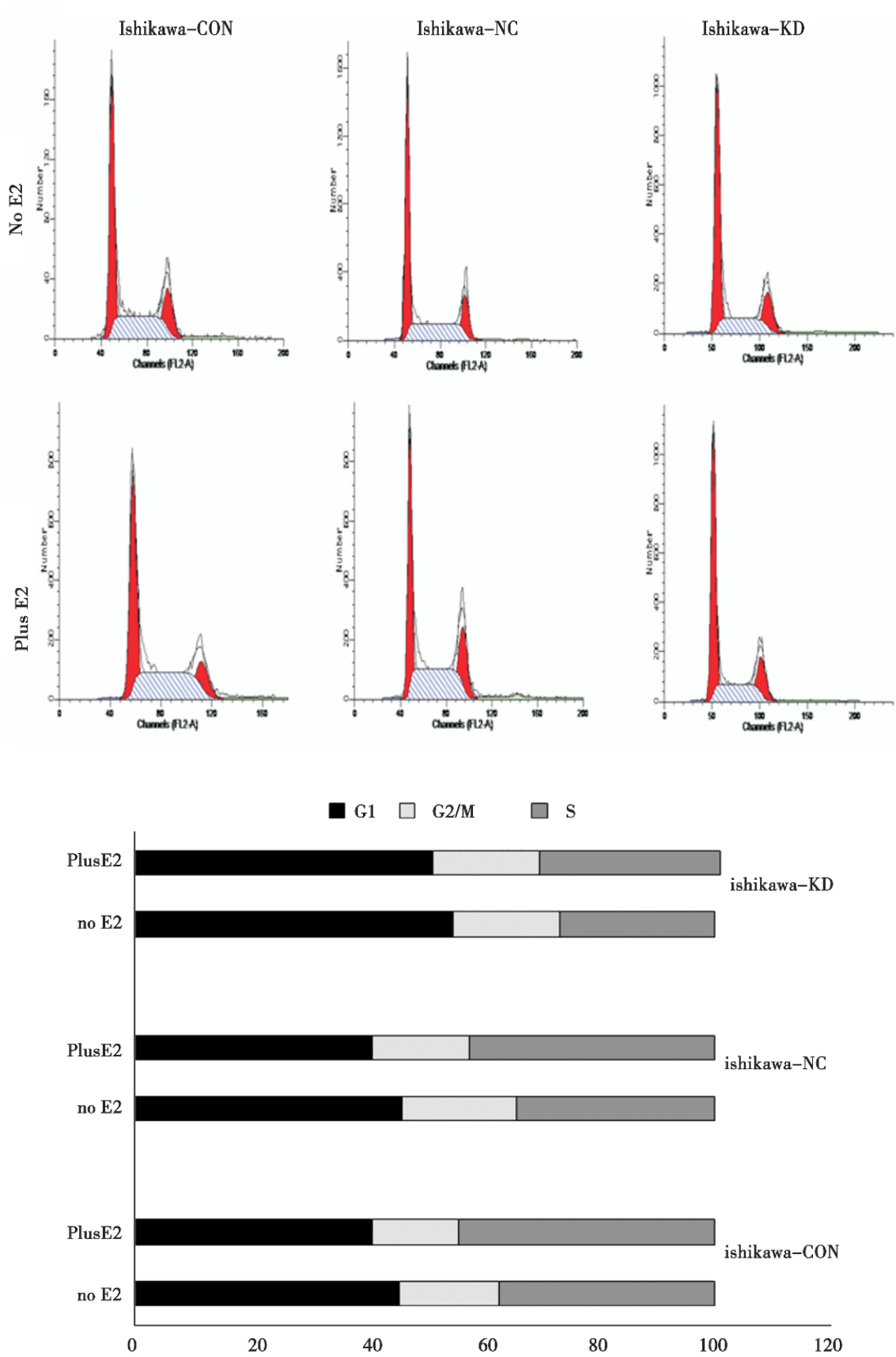


图 5 流式细胞仪检测 3 组细胞细胞周期分布情况

Fig.5 Cell cycle distribution of three groups detected by flow cytometry analysis

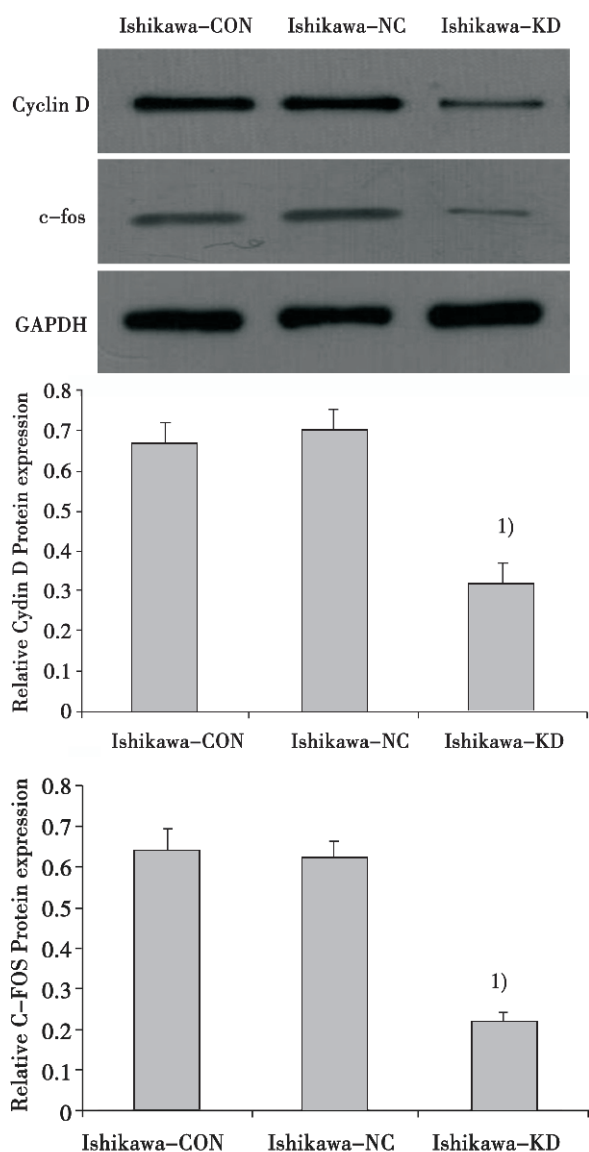


图 6 沉默 PELP1/MNAR 对 ER 下游基因水平表达的影响

Fig.6 Effect of PELP1 knockdown on the expression of ER target genes

1)  $P < 0.05$  vs CON and NC group

节核受体介导的转录和其他细胞内功能中发挥重要作用。其功能的紊乱可能导致多种病理情况发生,包括肿瘤。核受体共调节因子作为原癌基因发挥作用成为肿瘤研究中的新兴领域,展示了其具备成为肿瘤治疗的新靶点的潜力<sup>[5-6]</sup>。

PELP1/MNAR 是一个新的核受体共调节因子,它与雌激素受体的两种亚型 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  均能作用,调节其基因组和非基因组功能,可能在激素依赖性肿瘤的发生发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。既往研

究发现 PELP1 在多种激素依赖性肿瘤中表达和分布异常,包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等,其与肿瘤的发生发展转移和激素治疗的耐药均相关。为了解 PELP1/MNAR 是否在子宫内膜癌发生发展中发挥一定作用,我们首先研究了 PELP1/MNAR 在子宫内膜癌细胞中的表达情况,结果发现在多株不同子宫内膜癌细胞系中,PELP1/MNAR 蛋白均广泛表达,且 PELP1/MNAR 的表达与 ER $\alpha$  及  $\beta$  的表达状态无明显相关性。PELP1 最初被发现是一种雌激素受体共调节因子,最近研究也发现,PELP1 作为核受体共调节因子,不仅能调节 ER 的功能,同时也可以调节其他的核受体如 ERR、GR、AR 等的功能。最新的一项研究表明,在 ER 阴性的乳腺癌组织和细胞中,PELP1 依然高表达,且在乳腺癌肿瘤的转移中发挥作用<sup>[8]</sup>。亚细胞定位方面,在子宫内膜癌细胞株中,PELP1 表达主要定位在细胞核,与其参与调节核受体功能的作用一致。

为进一步研究 PELP1 在子宫内膜癌发生发展中的作用,我们运用了 RNAi 技术,人工合成短发夹环 RNA (shRNA),通过重组慢病毒载体介导基因转导,特异性、稳定地沉默 PELP1 基因在子宫内膜癌细胞中的表达水平。通过 Real-time PCR 和 Western blot 鉴定证实所构建的慢病毒载体能够有效抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中 PELP1/MNAR 水平的表达,在 RNA 和蛋白水平的干扰效率可以高达 86% 和 65%,能保证后续试验的顺利进行。

既往研究发现,PELP1/MNAR 在乳腺癌 E2 介导的细胞增殖中发挥重要作用。Vadlamudi 等<sup>[3]</sup>也曾报道使用 siRNA 干扰子宫内膜癌细胞 PELP1 蛋白的表达,导致细胞的基础增殖及 E2 介导的细胞增殖均受到抑制。对细胞周期的研究发现,PELP1/MNAR 在雌激素介导的 G1-S 期细胞周期调控中发挥重要作用。在乳腺癌细胞中过表达 PELP1,能使细胞周期调控蛋白 pRb 在 E2 刺激下持续过磷酸化,从而刺激细胞生长。最近一项研究表明,PELP1 是新的细胞周期依赖激酶 4 (cyclin-dependent kinase4, CDK4) 和 CDK2 的作用底物,PELP1 募集在 E<sub>2</sub>F 的靶基因附近,发挥共调节因子作用,并影响 CDK 的磷酸化状态,在乳腺癌细胞中加速细胞周期进程,促进肿瘤形成。在乳腺癌细胞 MCF-7 中,下调 PELP1 的表达可以引起多个细胞周期相关基因的表达下降<sup>[9]</sup>。在我们的实

验中,我们发现在子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中沉默 PELP1 的表达,细胞周期中 S 期的比例下降,细胞阻滞在 G0/G1 期, KD 组细胞生长速度减慢、倍增时间延长,细胞增殖发生抑制。

雌激素与 ER 结合后,能激活下游靶基因,包括 pS2、c-Myc、c-Fos、CyclinD1、Bcl-2、VEGF 等,参与细胞增殖、分化等重要的生理功能,因此雌激素及其受体水平或/和他们介导的信号转导功能的改变,会导致细胞生命活动的紊乱,诱发子宫内膜癌等癌症。在多种激素依赖性肿瘤,包括乳腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌细胞中,过表达或沉默 PELP1/MNAR 水平的表达,均可直接影响到雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)的转录水平<sup>[10]</sup>。虽然 PELP1 本身没有 DNA 结合区域,但它能与 ER 结合,促进 ER 对下游基因的转录,免疫共沉淀结果表明,PELP1 能与 ER $\alpha$  的靶基因的启动子结合,如 PR、pS2、IGF 等,也有报道其可以在转录水平调节 cyclin D1 的表达。同时生长因子信号通路的激活可以导致 PELP1 与 STAT3 的结合,从而影响下游基因如 c-fos、c-JUN、cyclin D 的转录<sup>[11]</sup>。在我们的研究中,同样我们发现在子宫内膜癌细胞 Ishikawa 中沉默 PELP1 的水平可以导致 ER 下游基因表达水平的变化,c-fos、cyclin D1 表达水平下降。这些基因水平的变化,进一步解释了沉默 PELP1 影响的子宫内膜癌细胞生长和周期的变化。

综上所述,本研究首次在子宫内膜癌细胞中探讨了慢病毒介导沉默 PELP1/MNAR 对细胞增殖、周期的影响,发现子宫内膜癌细胞中 PELP1/MNAR 普遍高表达。在子宫内膜癌 Ishikawa 细胞内沉默 PELP1/MNAR 的表达能抑制细胞生长、使细胞阻滞在 G1 期,并下调 ER 靶基因 c-fos、cyclinD1 水平。PELP1/MNAR 可能在子宫内膜癌的发生、发展中起一定作用,有望成为子宫内膜癌治疗的潜在靶点。为进一步证实 PELP1/MNAR 在子宫内膜癌中的作用,还需进一步进行体内实验进行验证。本研究还发现 PELP1/MNAR 在雌激素受体阴性表达的子宫内膜癌细胞中同样高表达,其在 ER 阴性的子宫内膜癌细胞中发挥的作用有待下一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Cortez V, Mann M, Tekmal S, et al. Targeting the PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy for breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(4): R108
- [2] Chakravarty D, Tekmal RR, Vadlamudi RK. PELP1: A Novel Therapeutic Target for Hormonal Cancers [J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(3): 163 - 168.
- [3] Vadlamudi RK, Balasenthil S, Roaddus RR, et al. Deregulation of estrogen receptor coactivator proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein-1/modulator of nongenomic activity of estrogen receptor in human endometrial tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(12): 6130 - 6138
- [4] 杨越波, 李小毛, 向阳. 子宫肿瘤 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 190-191.  
Yang YB, Li XM, Xiang Y. *Neoplasms In Uterus* [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2011: 190-191.
- [5] O'Malley BW. Coregulators: "from whence came these master genes" [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(5): 1009-1013.
- [6] Lanard DM, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators and human disease [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28(5): 575-587.
- [7] Lang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis [J]. *Nature Rev Cancer*, 2006, 5(6): 360 - 368.
- [8] Roy S, Chakravarty D, Cortez V, et al. Significance of PELP1 in ER-negative breast cancer metastasis [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(1): 25-33.
- [9] Nair BC, Nair SS, Chakravarty D, et al. Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Phosphorylation Plays a Critical Role in the Oncogenic Functions of PELP1 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7166-7175.
- [10] Chakravarty, D, Roy SS, Babu CR, et al. Therapeutic targeting of PELP1 prevents ovarian cancer growth and metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8): 2250-2259.
- [11] Gonugunta VK, Nair BC, Rajhans R, et al. Regulation of rDNA transcription by proto-oncogene PELP1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21095.

(编辑 徐杰)