

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.001

· 基础研究 ·

乳腺癌中 CELF6 的表达水平及其与预后的关系 *

张倩文^{1,2} 柳 刚^{1,2} 夏 丽² 李 佳² 蔡 锦² 许乃寒^{2Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院生命与健康重点实验室 广东 深圳 518000)

摘要 目的:研究 CELF6 在乳腺癌组织与正常组织中的表达差异以及其在乳腺癌中的预后意义。**方法:**采用 GEPIA 分析乳腺癌组织与正常乳腺组织中 CELF6 的表达差异,免疫组化检测乳腺癌组织 CELF6 蛋白的表达。KM-plotter 在线分析 TCGA 数据库中 CELF6 的表达差异与乳腺癌患者生存预后的关系,CCK8 实验分析不同 CELF6 表达水平对乳腺癌细胞生长增殖的影响。**结果:**GEPIA 在线软件分析结果显示乳腺癌 CELF6 表达较与正常组织显著降低($P < 0.001$)。免疫组化检测结果显示乳腺癌患者的乳腺癌组织 CELF6 的阳性表达显著低于癌旁的正常组织。KM-plotter 在线分析的生存曲线显示 CELF6 高表达的乳腺癌患者生存预后显著优于低表达者($P < 0.001$)。CCK8 实验显示敲低乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 CELF6 的表达,细胞增殖速度显著变快,而过表达 CELF6 的 MDA-MB-231 细胞的增殖速度减慢。**结论:**CELF6 可能作为潜在的抑癌基因,在乳腺癌组织中低表达,与乳腺癌患者预后不良有关。

关键词:CELF6;乳腺癌;预后

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)19-3601-05

Expression and Prognostic Significance of CELF6 in the Breast Cancer*

ZHANG Qian-wen^{1,2}, LIU Gang^{1,2}, XIA Li², LI Jia², CAI Jin², XU Nai-han^{2Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Key Lab in Healthy Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To study the differential expression of CELF6 in breast cancer and normal tissues and its prognostic significance in breast cancer. **Methods:** The expression of CELF6 in breast cancer tissues and normal breast tissues was analyzed by GEPIA. The clinical samples of breast cancer were used to study the expression level of CELF6 protein in breast cancer tissues compared with normal tissues. KM-plotter was used to study the relationship between the expression of CELF6 and the prognosis survival of breast cancer patients. The effect of different CELF6 expression levels on the growth and proliferation of breast cancer cells was analyzed by CCK8 cell counting assay. **Results:** GEPIA online software analysis showed that CELF6 expression was significantly lower in breast cancer than in normal tissues ($P < 0.001$). The results of immunohistochemistry showed that the positive expression of CELF6 in breast cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues adjacent to cancer. The survival curve of KM-plotter online analysis showed that the survival prognosis of patients with high expression of CELF6 was significantly better than those with low expression ($P < 0.001$). The CCK8 assay showed that the expression of CELF6 in the breast cancer cell line MDA-MB-231 was knocked down, the cell proliferation rate was significantly faster, and the proliferation rate of MDA-MB-231 cells overexpressing CELF6 was slowed down. **Conclusions:** CELF6 may be a potential tumor suppressor gene, which is lowly expressed in breast cancer tissues and is associated with poor prognosis in breast cancer patients.

Key words: CELF6; Breast cancer; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3601-05

前言

乳腺癌发生率在全球女性恶性肿瘤中居首位^[1],目前主要的治疗方法为外科手术^[2,18],术后的辅助治疗手段包括放疗^[8]、化疗、内分泌治疗方案^[7]以及分子靶向药物^[9]治疗等。尽管

目前针对乳腺癌的诊断治疗手段在不断进步,乳腺癌的致死率在全球范围内仍然很高,进一步提高乳腺癌的治疗和预后监测手段很有必要。

CELF6 属于 RNA 结合蛋白 CELF 家族^[4,13],此家族中 CELF1 可促进癌细胞的增殖,而 CELF2 可作为抑癌基因^[10-12],研

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(31571418)

作者简介:张倩文,女,硕士研究生,主要研究方向:细胞生物学,E-mail: zhangqw15@163.com

Δ 通讯作者:许乃寒,女,博士生导师,副教授,主要研究方向:细胞生物学,E-mail: xu.naihan@sz.tsinghua.edu.cn,电话:13510858112

(收稿日期:2019-04-28 接受日期:2019-05-23)

究表明这两个基因参与众多的细胞生命活动。而针对这个家族中的其他成员 CELF3~6 的研究很少^[45]。目前的研究表明 CELF6 主要在胚胎的神经系统表达,与神经系统的相关功能有关^[36],其在精巢和肾脏中也有表达^[19,20]。本研究主要分析了 CELF6 在乳腺癌组织与正常组织中的表达差异以及其在乳腺癌预后预测中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>); KM-plotter (<http://km-plot.com/analysis/>); 细胞 MDA-MB-231 来源于 ATCC; DMEM、opti-MEM、PBS、Trypsin 以及转染试剂 lip2000 和 lip3000 购买自 Invitrogen; pCDNA3.1-CELF6-His 由本实验构建; CELF6 siRNA 购买于 Santa Cruz; 胎牛血清 (fetal bovine serum) 购于 BOWEST 公司; CCK-8 试剂购买自 MCE 公司; 免疫组化芯片购于上海芯超生物公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 细胞实验 使用 0.25% Trypsin 消化 MDA-MB-231 细胞,加入含有 10%FBS 的培养基终止消化,将细胞种板于 96 孔板中 5000 细胞/孔。24 h 后去除孔中原有的培养基,加入 100 μ L 新鲜培养基和 10 μ L 的 CCK-8 试剂混匀,培养箱培养 2 h 后,测 450 nm 处吸光值。

1.2.2 转染 将 MDA-MB-231 细胞用 Trypsin 消化后种板于六孔板 40 万/孔,待其贴壁。将 lip3000 对应应用 opti-MEM 稀释,再将 lip3000 和质粒混合均匀,静置,加入同体积的基础培养基混合后加入六孔板中培养细胞,6 小时后换液。

1.2.3 免疫组化 将石蜡切片置于烘箱中 2 小时,烘片脱蜡, PBS 冲洗三次,滴加浓度为 3%的 H_2O_2 ,室温孵育 10 min, PBS 冲洗三次,吸去 PBS, 5%BSA 封闭 1 小时,去除封闭液,滴加 CELF6 抗体(用 3%BSA 1:1000 稀释), 4℃孵育过夜, PBST 洗三次,滴加带有生物素标记的二抗,孵育 30 min, PBST 洗三次,显色。

1.3 统计学分析

本文中统计免疫组化结果以及制作细胞生长曲线使用的软件为 GraphPad Prism 8.0.1,包括分析乳腺癌以及正常组织中 CELF6 的表达差异,使用的检验标准为 t 检验,生存曲线使用的是 Log-Rank 检验模型,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多种癌症组织中 CELF6 mRNA 的表达低于正常组织

采用在线分析软件 GEPIA 分析不同癌症组织中 CELF6 的 mRNA 水平。如图 1 所示,在大多数癌症组织中,CELF6 的 mRNA 表达水平低于正常组织。只有在少数种类的肿瘤组织,如胆管癌(Cholangiocarcinoma, CHOL)、急性髓细胞白血病(Acute Myeloid Leukemia, LAML)、嗜铬细胞瘤与副交感神经瘤(Pheochromocytoma and Paraganglioma, PCPG)等组织中 CELF6 的 mRNA 呈高表达。基于 TCGA 数据库分析腺浸润性导管癌(Breast Cancer, BRCA)数据,数据样本包括 1085 例乳腺浸润性导管癌组织样本以及 291 例正常的组织样本,结果表明 CELF6 在癌组织中 mRNA 的水平明显低于正常组织($P < 0.01$)。

2.2 乳腺癌组织中 CELF6 蛋白呈低表达

以公司购买的乳腺癌组织以及相应的正常癌旁组织为样本进行免疫组化实验,如图 2 所示,细胞中染色为淡化色到深褐色为染色阳性的细胞,乳腺癌组织中 CELF6 蛋白在的染色程度低于正常癌旁组织中的染色程度,说明 CELF6 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平低于癌旁组织中的表达。

2.3 CELF6 的表达水平与乳腺癌患者生存预后的关系

利用在线分析网站 KM-plotter 对乳腺癌患者的五年生存率进行 Kaplan-Meier 分析。采用中位数分组法将乳腺癌总生存率数据样本分为 CELF6 高表达样本组 ($n=714$) 以及低表达组 ($n=714$)。如图 2 所示,CELF6 高表达组的五年生存率显著低于低表达组。采用中位数分组法将乳腺癌无复发生存率样本分为 CELF6 高表达组($n=1674$)和低表达组($n=1492$),如图 3 所示, CELF6 高表达组的五年生存率显著低于低表达组。以上结果提示 CELF6 的表达差异对乳腺癌患者的生存预后具有显著影响, CELF6 高表达的乳腺癌患者的生存预后情况较好。

2.4 CELF6 的表达对乳腺癌细胞 MDA-MB231 生长增殖的影响

分别转染质粒 pCDNA3.1-CELF6-His 质粒以及特异性靶向 CELF6 mRNA 序列的 siRNA 进入 MDA-MB231,使得细胞中 CELF6 的表达量升高或者降低。如图 4 所示,转染 CELF6 靶向的 siRNA 细胞在转染后的第三天以及第四天的细胞数量显著多于对照组($P < 0.001$),而 CELF6 过表达的细胞同样在转染后第三天以及第四天的细胞数量显著少于转染空载的对照组细胞($P < 0.001$)。以上结果说明在乳腺癌细胞 MDA-MB231 中,CELF6 过表达会抑制细胞的增殖,而敲低 CELF6 会促进细胞的生长增殖。

3 讨论

CELF 家族蛋白在肿瘤形成过程中起到的作用并不相同。既往研究表明 CELF1 是一个肿瘤促进因子,而 CELF2 是一个潜在的肿瘤抑制因子^[21]。本实验通过对 TCGA 的 RNA-seq 数据中乳腺癌样本进行分析,同时结合乳腺癌患者的临床样本的免疫组化结果,发现 CELF6 在 mRNA 以及蛋白水平在乳腺癌中表达量明显低于正常组织,提示 CELF6 在乳腺癌中可能发挥着抑癌作用。而 Kaplan-Meier 生存曲线表明 CELF6 高表达的乳腺癌患者预后更好。细胞增殖实验表明 CELF6 高表达乳腺癌细胞的增殖受到了抑制,而下调 CELF6 的表达会促进乳腺癌细胞的增殖。因此,CELF6 可能通过参与乳腺细胞内生长增殖的细胞通路影响乳腺癌的发生发展。

RNA 结合蛋白通过与 mRNA 结合参与蛋白的转录后加工过程,从而对蛋白的表达进行调控^[16,21]。目前研究表明 RNA 结合蛋白参与调控乳腺癌的发生发展过程^[29,30]。例如, RNA 结合蛋白 HuR (human antigen R)通过转录后调控 PDGFC 血小板衍生生长因子 C,其具体作用机制为 HuR 与 PDGFC mRNA 的 3'UTR 区域结合,上调 PDGFC,进而影响乳腺癌细胞的增殖转移^[2]。乳腺癌中重要的诊断以及预后指标 ER α 的表达水平受到 RNA 结合蛋白 RNPC1 调节^[24],且 RNPC1 在乳腺癌作为一个肿瘤抑制因子,通过与 ER α mRNA 的 3' UTR 区域结合,增强 mRNA 的稳定性^[25]。CELF6 结构中含有三个 RNA 识别基序(RNA recognize motif, RRM)^[4]。目前关于 CELF6 的研究主要集中在 CELF6 对神经系统功能的影响^[27,28]。例如,在小鼠中

Celf6 的缺失将导致小鼠出现自闭症障碍的表型, 以及人类的自闭症障碍疾病与 CELF6 的表达有关^[26]。而关于 CELF6 在肿瘤中的研究很少。本研究结果表明 CELF6 的表达能影响肿瘤细胞的生长增殖, 很有可能是通过结合相应蛋白的 mRNA 从而参与相应蛋白的转录后调控。后续若进一步研究 CELF6 抑

制乳腺肿瘤细胞的机理, 可进行 RIP (RNA Immunoprecipitation) RNA 结合蛋白免疫沉淀实验^[15], 将 RNA 结合蛋白 CELF6 在细胞中结合的 mRNA 沉淀, RNAseq 检测出 CELF6 结合的 RNA 具体序列, 为 CELF6 参与调控的细胞信号通路提供参考, 进一步揭示在乳腺癌中的抑癌机制。

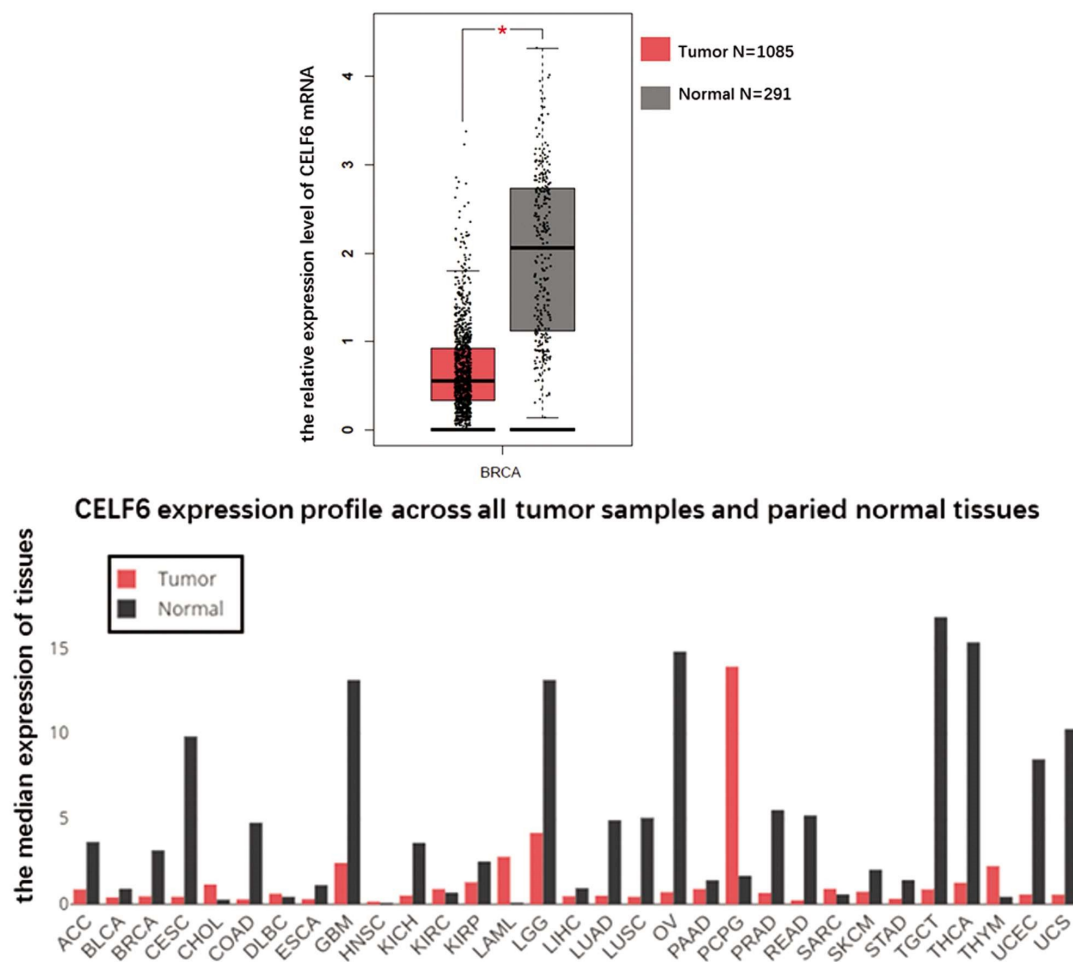


图1 乳腺癌样本与正常组织样本中 CELF6 的 mRNA 表达差异

Fig.1 The expression of CELF6 mRNA in the BRCA samples and paired normal samples

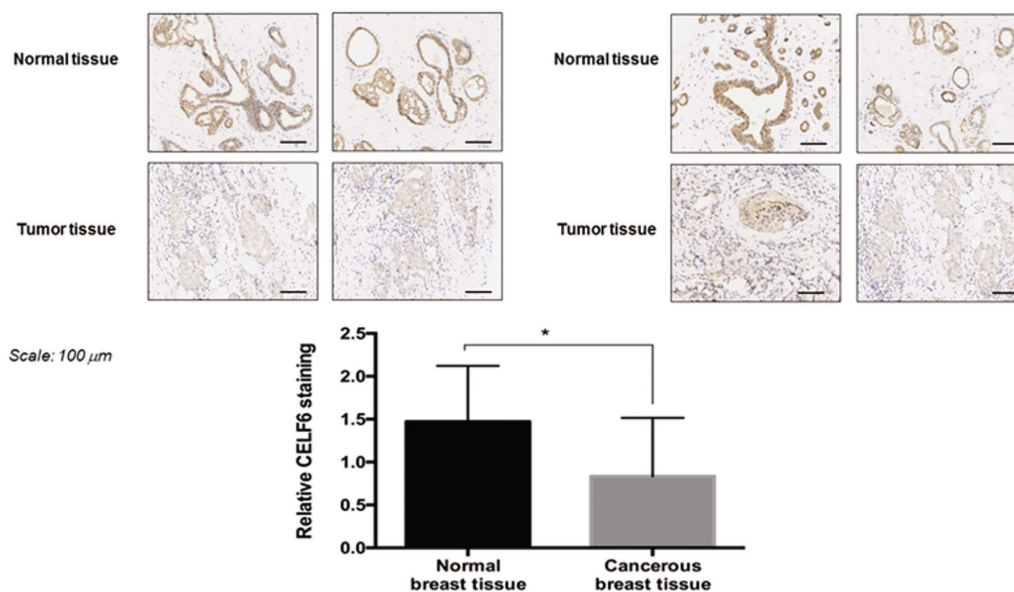


图2 乳腺癌组织中 CELF6 蛋白表达低于正常组织

Fig.2 The expression of CELF6 in the breast cancer tissues and normal breast tissues

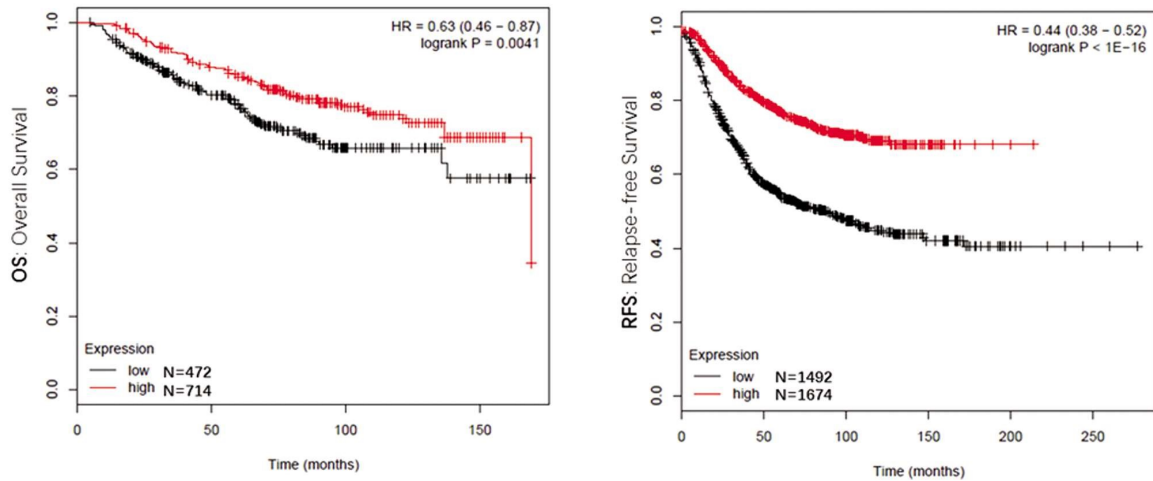


图 3 CELF6 表达与乳腺癌患者生存预后之间的关系

Fig.3 The relationship between CELF6 expression and the prognosis of breast cancer patient

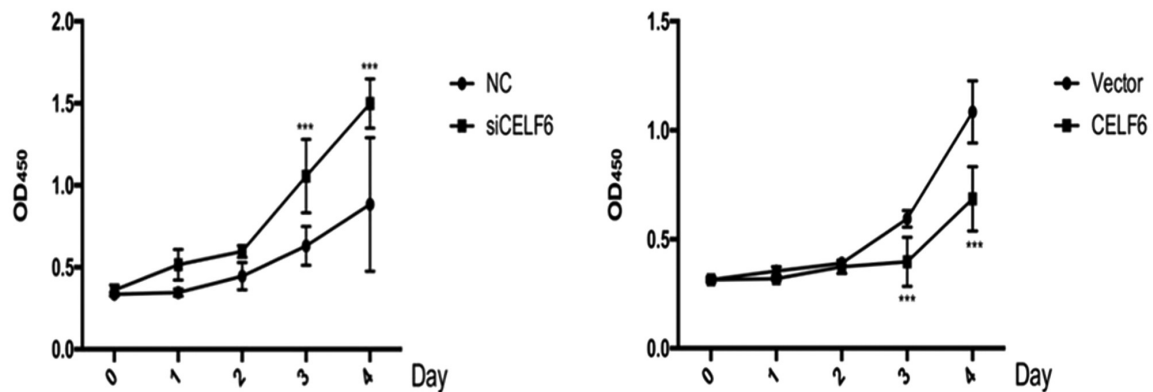


图 4 过表达和敲低 CELF6 的表达对 MDA-MB231 细胞增殖的影响

Fig.4 The effect CELF6 overexpression or knockdown on the proliferation of MDA-MB231 cells

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$. *** $P < 0.001$

总之, 本研究结果表明 CELF6 除了目前已知的在神经系统中发挥作用外, 在乳腺在中是一个潜在的抑癌因子, 推测其可能的抑癌机制是通过与相关蛋白的 mRNA 非编码区域结合调控下游蛋白 mRNA 的转录后加工过程。本文为研究乳腺癌的发生发展机制研究提供了新的方向。

参考文献(References)

- [1] DeSantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2014, 64(1): 52-62
- [2] Bonilla J A M, Tabanera M T, Mendoza L H R. Breast cancer in the 21st century: From early detection to new therapies [J]. Radiología (English Edition), 2017, 59(5): 368-379
- [3] Ladd A N. CUG-BP, Elav-like family (CELF)-mediated alternative splicing regulation in the brain during health and disease [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2013, 56: 456-464
- [4] Dasgupta T, Ladd A N. The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2012, 3 (1): 104-121
- [5] Maloney S E, Khangura E, Dougherty J D. The RNA-binding protein CelF6 is highly expressed in diencephalic nuclei and neuromodulatory cell populations of the mouse brain [J]. Brain Structure and Function, 2016, 221(4): 1809-1831
- [6] Brimacombe K R, Ladd A N. Cloning and embryonic expression patterns of the chicken CELF family[J]. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2007, 236(8): 2216-2224
- [7] Potkul R K, Unger J M, Livingston R B, et al. Randomized trial of medroxyprogesterone acetate for the prevention of endometrial pathology from adjuvant tamoxifen for breast cancer: SWOG S9630 [J]. NPJ Breast Cancer, 2016, 2: 16024
- [8] Wu J, Zhang J, Yin L, et al. HAP1 gene expression is associated with radiosensitivity in breast cancer cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 456(1): 162-166
- [9] Sonnenblick A, Pondé N, Piccart M. Metastatic breast cancer: The Odyssey of personalization [J]. Molecular oncology, 2016, 10 (8): 1147-1159
- [10] Jakstaite A, Maziukiene A, Silkuniene G, et al. Upregulation of cugbp2 increases response of pancreatic cancer cells to chemotherapy [J]. Langenbeck's archives of surgery, 2016, 401(1): 99-111
- [11] Ramalingam S, Ramamoorthy P, Subramaniam D, et al. Reduced expression of RNA binding protein CELF2, a putative tumor suppressor gene in colon cancer[J]. Immuno-gastroenterology, 2012, 1(1): 27
- [12] Guo Y M, Sun M X, Li J, et al. Association of CELF2 polymorphism and the prognosis of nasopharyngeal carcinoma in southern Chinese

- population[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 27176
- [13] Wang E T, Ward A J, Cherone J M, et al. Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins [J]. *Genome research*, 2015, 25(6): 858-871
- [14] Magiera K, Tomala M, Kubica K, et al. Lithocholic acid hydroxamide destabilizes cyclin D1 and induces G0/G1 arrest by inhibiting deubiquitinase USP2a [J]. *Cell chemical biology*, 2017, 24 (4): 458-470. e18
- [15] Chai Y, Liu J, Zhang Z, et al. HuR-regulated lnc RNA NEAT 1 stability in tumorigenesis and progression of ovarian cancer [J]. *Cancer medicine*, 2016, 5(7): 1588-1598
- [16] Hasan A, Cotobal C, Duncan C D S, et al. Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability[J]. *PLoS genetics*, 2014, 10(11): e1004684
- [17] 吴迪, 王大路, 梁逸超, 等. 基于 Oncomine 和 GEPIA 数据库分析 NFE2L3 基因在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华临床医师杂志*, 2018, 12(12):651
- [18] 罗年安, 屈亚琦, 董瑞. 乳腺癌的治疗进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(1)
- [19] Ladd A N, Nguyen N H, Malhotra K, et al. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 17756-17764
- [20] Loria P M, Duke A, Rand J B, et al. Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission [J]. *Current biology*, 2003, 13(15): 1317-1323
- [21] Zhang R L, Yang J P, Peng L X, et al. RNA-binding protein QKI-5 inhibits the proliferation of clear cell renal cell carcinoma via post-transcriptional stabilization of RASA1 mRNA [J]. *Cell Cycle*, 2017, 15(22):3094-3104
- [22] Luo N A, Qu Y Q, Yang G D, et al. Post-Transcriptional Up-Regulation of PDGF-C by HuR in Advanced and Stressed Breast Cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15 (11): 20306-20320
- [23] Hurst N J, Najy A J, Ustach C V, et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(3): 909-918
- [24] Shi L, Xia T S, Wei X L, et al. Estrogen receptor (ER) was regulated by RNPC1 stabilizing mRNA in ER positive breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(14): 12264-12278
- [25] Xue J Q, Xia T S, Liang X Q, et al. RNA-binding protein RNPC1: acting as a tumor suppressor in breast cancer.[J]. *Bmc Cancer*, 2014, 14(1): 322
- [26] Maloney S E, Khangura E, Dougherty J D. The RNA-binding protein Celf6 is highly expressed in diencephalic nuclei and neuromodulatory cell populations of the mouse brain [J]. *Brain Structure and Function*, 2016, 221(4): 1809-1831
- [27] Ladd AN, Nguyen NH, Malhotra K, et al. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279: 17756-17764
- [28] Dougherty JD. The disruption of Celf6, a gene identified by translational profiling of serotonergic neurons, results in autism-related behaviors[J]. *J Neurosci*, 2013, 33: 2732-2753
- [29] Zhou X J, Wu J, Shi L, et al. PTEN expression is upregulated by a RNA-binding protein RBM38 via enhancing its mRNA stability in breast cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36(1): 149
- [30] Sakari V, Marney C B, Weiping S, et al. Loss of the multifunctional RNA-binding protein RBM47 as a source of selectable metastatic traits in breast cancer[J]. *eLife*, 2014, 3: 1548-1559
- [31] Zhang R L, Yang J P, Peng L X, et al. RNA-binding protein QKI-5 inhibits the proliferation of clear cell renal cell carcinoma via post-transcriptional stabilization of RASA1 mRNA [J]. *Cell Cycle*, 2017, 15(22): 3094-3104
-
- (上接第 3664 页)
- [25] Ban H, Sugimoto M, Otsuka T, et al. Usefulness of the clip-flap method of endoscopic submucosal dissection: A randomized controlled trial[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(35): 4077-4085
- [26] Li PC, Ding DC. Transvaginal Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery Hysterectomy in a Woman with Uterine Adenomyosis and Multiple Severe Abdominal Adhesions [J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2018, 7(2): 70-73
- [27] Adler JM, Sethi A. Interventional Endoscopic Ultrasonography in the Pancreas[J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2018, 28(4): 569-578
- [28] Choi W, Nam W, Lee C, et al. Long-term Outcomes of Endoscopic Anti-reflux Surgery in Pediatric Patients with Vesicoureteral Reflux: Urinary Tract Infection, Renal Scarring, and Predictive Factors for Success[J]. *J Korean Med Sci*, 2018, 33(38): e240
- [29] Pawar A, Manwani C, Thete R, et al. Endoscopic Decompression Can Be Effective for Diagnosing and Treating Tubercular Spondylodiskitis with Early Epidural Spinal Compression: A Retrospective Study of 18 Cases[J]. *Asian Spine J*, 2018, 12(5): 803-809
- [30] Liu YP, Jiang WW, Chen GX, et al. Case report and review of the literature of primary gastrointestinal amyloidosis diagnosed with enteroscopy and endoscopic ultrasonography [J]. *World J Clin Cases*, 2018, 6(9): 284-290