

CSN4 基因干扰对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响

余同露^{1,2}, 蔡栋梁^{1,2}, 朱根凤^{1,2}, 叶晓娟^{1,2}, 闵太善^{1,2}, 陈红岩^{1,2},
卢大儒^{1,2}, 陈浩明^{1,2}

1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438

2. 复旦大学现代人类学教育部重点实验室, 上海 200438

摘要: 乳腺癌目前是危害女性常见的恶性肿瘤, 研究发现 COP9 复合体中的各个亚基与恶性肿瘤的发生发展密切相关, 且 CSN4 亚基对整个复合体具有很重要的调节作用。为探讨 CSN4 基因在乳腺癌细胞中的生物学功能及其分子作用机制, 本研究首先在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中, 成功建立了慢病毒介导的 CSN4 基因的干扰表达体系, 并通过细胞表型实验、CCK8 实验和细胞克隆形成实验证实 CSN4 基因表达的干扰能显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖速率和克隆形成能力。流式细胞检测结果表明, 干扰 CSN4 的表达能显著增加 Sub G₁ 期乳腺癌 MDA-MB-231 细胞比例; 凋亡检测结果表明, 干扰 CSN4 的表达能显著增加早期凋亡和晚期凋亡细胞的比例, 这证明干扰 CSN4 的表达能够促进乳腺癌细胞凋亡。最后, 通过 Western blot 实验证实 CSN4 能调控 CDK6 和 Caspase3 蛋白的表达, 激活 Caspase3 切割 PARP, 揭示 CSN4 可调控 CDK6 和 Caspase3 的表达从而影响乳腺癌细胞的增殖和凋亡。本研究结果进一步加深了人们对乳腺癌细胞凋亡和细胞生长的分子机制的认识, 同时也进一步揭示了 CSN4 在肿瘤生物学中的作用和机制。

关键词: 乳腺癌; CSN4; 细胞增殖; 细胞凋亡; CDK6; Caspase3

Effects of CSN4 knockdown on proliferation and apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells

Tonglu YU^{1,2}, Dongliang Cai^{1,2}, Genfeng Zhu^{1,2}, Xiaojuan Ye^{1,2}, Taishan Min^{1,2},
Hongyan Chen^{1,2}, Daru Lu^{1,2}, Haoming Chen^{1,2}

1. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

2. MOE Key Laboratory of Contemporary Anthropology, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: Breast cancer is one of the most common malignant tumors endangering women. It has been found that the

收稿日期: 2018-12-11; 修回日期: 2019-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号 81071739, 81272385)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81071739, 81272385)]

作者简介: 余同露, 硕士研究生; 专业方向: 生物工程。E-mail: 15210700122@fudan.edu.cn

通讯作者: 陈浩明, 博士研究生, 副教授, 研究方向: 遗传学。E-mail: hmchen@fudan.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-278

网络出版时间: 2019/3/15 17:28:20

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190315.1728.002.html>

subunits of the COP9 complex are closely related to the occurrence and development of malignant tumors, and the *CSN4* subunit plays an important role in regulating the whole complex. In the breast cancer cell line MDA-MB-231, we successfully established a lentivirus-mediated *CSN4*-knockdown cell line. CCK8 cell proliferation assays and colony formation experiments confirmed that *CSN4* knockdown significantly decreased the cellular proliferation rate. Cell cycle analysis showed that *CSN4* knockdown increased sub-G1 population and induced apoptosis. In addition, Western blotting assays confirmed that *CSN4* regulates the expression of CDK6 and Caspase3, suggesting that *CSN4* modulates the proliferation and apoptosis of breast cancer cells by regulating the expression of CDK6 and Caspase3 genes and thereby tumorigenesis. This study has deepened our understanding of the molecular mechanism of apoptosis and cell growth in breast cancers, and further revealed the role and mechanism of *CSN4* in cancer biology.

Keywords: breast cancer; *CSN4*; cell proliferation; cell apoptosis; CDK6; Caspase3

乳腺癌是危害女性健康最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年上升。据 GLOBOCAN (global cancer observatory) 的数据显示, 乳腺癌高居中国女性癌症发病率首位, 发病率为 21.6/10 万^[1]。2015 年, 中国新发乳腺癌高达 27 万例, 严重威胁女性健康^[2]。乳腺癌细胞的恶性增殖和转移是患者死亡的主要原因, 尤其是乳腺癌中恶性程度最高的三阴性乳腺癌^[3], 具有高转移性、强侵袭性和致死性强等特点, 因此, 揭示乳腺癌发生发展的分子机制对于科学研究和临床治疗均具有十分重要的意义。

CSN4 基因编码 COP9 信号复合体(COP9 signalosome complex, CSN)第 4 亚基。COP9 信号复合体在真核生物中高度保守, 对于细胞增殖、生长和生存都具有重要作用^[4-8]。COP9 复合体参与蛋白质泛素化过程, 对泛素降解的蛋白质如 p27、p53、Mdm2、Smad7 和 Skp2 等具有一定的调控作用^[9-16], 同时研究发现 COP9 复合体中的各个亚基的表达与很多恶性肿瘤的发生发展密切相关^[17-24]。

CSN4 基因曾被发现在前列腺癌细胞中, 干扰 *CSN4* 的表达能够抑制前列腺癌细胞的增殖^[25]。*CSN4* 亚基对整个复合体的稳定性以及复合体的其它亚基都具有重要的调节作用。本实验室前期通过 TCGA 数据库分析 *CSN4* 基因在肿瘤和正常组织样本的 mRNA 存在差异。在本实验室的前期研究工作中初步探索了 *CSN5* 在三阴性乳腺癌 TNBC (triple-negative breast cancer) 中的发生发展机制, 且大量文献也揭示 *CSN5* 确实影响乳腺癌的发生发展。文献中报道, 在 CSN 复合体的结构中, CSN 复合物在泛

素化途径中需要连接 cullin-RING E3 连接酶发挥作用, 而 *CSN5* 和 *CSN6* 在泛素化途径中共同发挥去 NEDD 化作用是需要 *CSN4* 协同作用。因此, 为进一步探讨 *CSN4* 是否在三阴性乳腺癌中发挥重要作用, 本研究在高转移性的三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中建立稳定干扰 *CSN4* 的表达体系, 通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi), 探讨了在三阴性乳腺癌细胞中抑制 *CSN4* 表达后, 对肿瘤细胞的细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响, 初步揭示 *CSN4* 参与调控 CDK6 和 Caspase3 的分子机制, 为进一步制定 *CSN4* 基因的临床治疗方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 293T 细胞为本实验室保存; 慢病毒包装相关质粒 VSVG、PLP1 和 PLP2 为本实验室保存; Trizol 和 Lipofectamin2000 试剂购自 Invitrogen 公司(美国); RNA 反转录试剂盒和定量 PCR 试剂购自南京诺维赞生物科技有限公司; HRP 标记的 Western blot 二抗均购自上海碧云天公司; 细胞凋亡检测试剂盒 Annexin V-PE/7-AAD 购自美国 BD 公司; *CSN4* 抗体购自美国 Novus 公司, Caspase3、 β -actin 和 CDK6 抗体均购自美国 Cell signaling 公司; 细胞培养试剂均购自 Gibco 品牌赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231 和 293T 细胞培养使用 DMEM 高糖培养基, 培养基中含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 的青霉素-链霉素双抗, 37 °C 置于 CO₂ 培养箱。

1.3 慢病毒包装

干扰 CSN4 表达的慢病毒 shRNA (对照), CSN4sh1 和 CSN4sh3 (干扰组)慢病毒包装时, 在 10 cm 培养皿的生长状态较好的 293T 细胞中, 加入 40 μL 的 Lipofectin2000 转染试剂、7.5 μg 表达 shRNA 的慢病毒载体质粒以及 3 种辅助质粒 VSVG、PLP1 和 PLP2 各 2.5 μg, 12 h 后换新鲜培养基, 再培养 48 h 后收集病毒上清, 2 000 r/min 离心 10 min, 上清用 0.45 μm 滤器过滤分装保存在 -80 °C 冰箱; 感染时, 取适量慢病毒加入到悬浮的乳腺癌细胞中, 并按照(1:1000)体积加入 10 mg/mL polybrene。

干扰 CSN4 基因表达的慢病毒 shRNA 序列: CSN4sh1: 5'-GCCCAAGTGTGGTGGGAATTT-3'; CSN4sh3: 5'-GCTCTCTTACAAGACAATAGT-3'。对照组慢病毒 shRNA 序列: 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'。

1.4 实时定量 PCR

收集慢病毒感染的细胞, 弃去上层培养基后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 TRIzol 裂解 5 min, 加入三氯甲烷震荡 15 s 后静置 2 min, 4 °C 离心后取上清, 再加入等量异丙醇充分混匀后放置 -20 °C 静置 10 min, 弃上清后留下沉淀并用 75% 乙醇洗涤 2 次, 4 °C 离心弃上清后晾干 10~20 min, 加入适量 DEPC 水溶解并测完浓度后保存于 -80 °C 冰箱。根据反转录试剂盒合成 cDNA, 实时荧光定量采用 SYBR Green I 荧光染料检测, 在 ABI 公司 7900HT 的定量 PCR 仪检测。GAPDH 基因作为内参, 实验进行 3 组重复; CSN4 上游引物: 5'-GTAAGCCTCTGCCTGGACTG-3', CSN4 下游引物: 5'-AGGAGCAGTTGCTTCCATA-3'。根据样本的 Ct 值计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, 计算每个肿瘤样品中的目的基因对于正常样品的倍数差异。首先计算出每个样品每个基因的 Ct 平均值, 然后计算 $\Delta Ct = Ct(\text{目标基因}) - Ct(\text{管家基因})$ 。本实验采取 GAPDH 作为管家基因, 首先计算每个样品中目的基

因的相对 Ct 值, 然后用公式 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验样本}) - \Delta Ct(\text{对照样本})$ 。重复 3 次试验计算 P 值。

1.5 Western blot

收集慢病毒感染后的细胞, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 1 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。吸上清转移入新的 Eppendorf 管, 测定蛋白浓度, 然后加入适量的蛋白上样缓冲液混匀后煮沸 5~10 min, 上样 30~100 μg 的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 恒流转膜 2 h, 转膜条件: 250 V, 0.3 A。封闭 1 h 后一抗二抗孵育, 加入 Thermo 显色剂, 在 G-BOX 显影仪曝光显影。

1.6 CCK-8 细胞增殖实验

将慢病毒感染后的各组细胞, 计数细胞后调整细胞密度, 按每孔 1000 个细胞接种于 96 孔板中, 每组 6 个重复, 细胞培养一定时间后 CCK-8 处理, 利用美国 Bio-Rad 公司酶标仪在 450 nm 波长下检测 OD 值。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

收集慢病毒感染后的状态较好的细胞, 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, PBS 洗涤 2 次。每组细胞加入 500 μL PBS, 包含 10 μg/mL 碘化丙啶(PI) 5 μL, 0.2% TritonX-100 75 μL 和 1 μg/mL RNase A 的染色液, 室温避光染色 15 min 后检测细胞 Sub G₁ 期, 通过 DNA 含量分析法分析结果。

1.8 克隆形成实验

将慢病毒感染后的细胞计数后, 按同等数目 1000 个细胞每孔传代到六孔板, 7~15 d 左右随时观察。待细胞长成肉眼可见的细胞集落, 开始处理细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 再用甲醇容易固定细胞 20 min, PBS 洗净, 加上 Gimasa 染色液染色 30 min。然后统计集落数。

1.9 统计分析

本研究中数值用“均值±标准差”表示, 所有实验重复 3 次以上, 组间通过 SPSS17.0 软件进行 t 检验, 用统计学分析方法检测差异是否具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 慢病毒介导的 *CSN4* 基因 shRNA 稳定干扰体系的构建

首先, 将 *CSN4* 基因的 shRNA 干扰慢病毒 (*CSN4sh1* 和 *CSN4sh3*) 和对照慢病毒 (shLuc) 分别感染 MDA-MB-231 细胞, 96 h 后用荧光显微镜观察慢病毒感染效率。然后, 分别提取感染后的细胞总 RNA 和总蛋白质, 通过实时定量 PCR 和 Western blot 方法检测细胞内 *CSN4* 的 mRNA 和蛋白的表达水平。结果表明, 根据可见光视野和荧光视野对比, 对照组和 *CSN4* 干扰组慢病毒感染乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 感染效率达到 90% 以上, 表明感染效率高 (图 1A); 实时定量 PCR 分析结果显示, 相比较对照组 shLuc, *CSN4* 干扰后的实验组的 mRNA 表达量显著低于用 shLuc 对照慢病毒感染的乳腺癌细胞, 检验统计分析差异极显著, 即 $P < 0.001$ (图 1B)。Western blot 实验结果显示, *CSN4* 干扰组的蛋白表达翻译水平显著低于对照组慢病毒感染的乳腺癌细胞 (图 1C)。上述研究结果表明, 慢病毒介导的 shRNA 干扰能有效抑制 *CSN4* 基因的 mRNA 和蛋白水平的表达, 本研究成功构建了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 *CSN4* 的表达干扰系统。

2.2 *CSN4* 表达干扰对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

使用对照组慢病毒和 *CSN4* 干扰组慢病毒分别感染 MDA-MB-231 细胞, 确认感染效率后, 使用 CCK-8 细胞生长速率试剂盒检测对照组和 *CSN4* 干扰组的细胞增殖速率。结果显示, 在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中, 相比较对照组, *CSN4* 干扰组的生长速率均显著低于对照 shLuc。统计分析表明, *CSN4* 干扰组和对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 2)。这表明 MDA-MB-231 细胞中 *CSN4* 基因的表达干扰使得细胞的增殖能力发生了显著的下降, 即 *CSN4* 基因对于 MDA-MB-231 的细胞增殖能力具有重要作用。

2.3 *CSN4* 表达干扰对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响

为进一步检测 *CSN4* 对乳腺癌细胞增殖能力的影响, 本研究检测了干扰 *CSN4* 后对乳腺癌细胞克隆形成能力的影响。结果发现, *CSN4* 基因干扰实验组的克隆细胞数相比对照组细胞数目少 (图 3A); 重复 3 次实验后的统计结果表明, 差异具有极其显著的统计学意义 (图 3B)。这说明 *CSN4* 基因表达被干扰后能够抑制了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的细胞

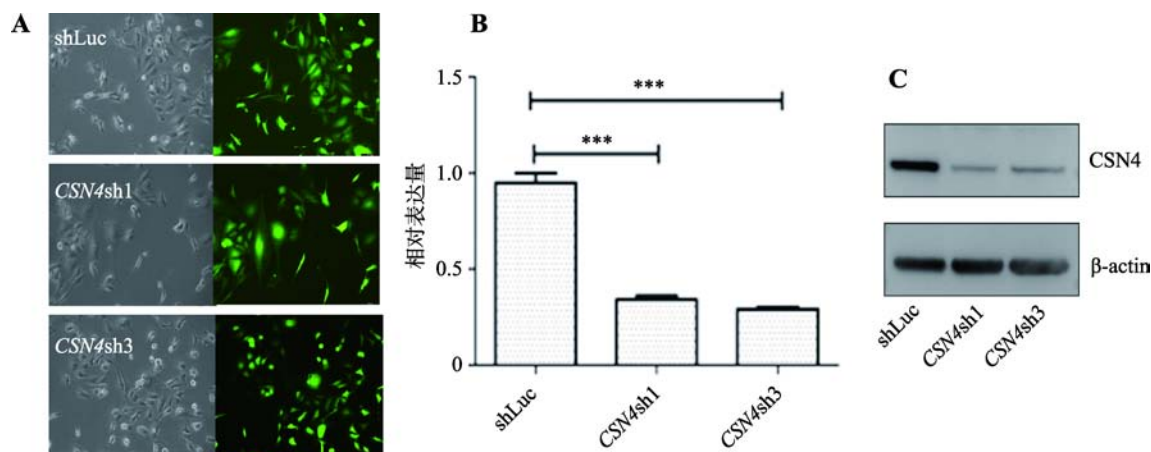


图1 MDA-MB-231 细胞中慢病毒介导的 *CSN4* 干扰表达的检测

Fig. 1 Knock down of *CSN4* expression by Lentivirus-mediated shRNA in MDA-MB-231 cells

A: 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞荧光拍摄图。左侧为可见光视野图片, 右侧为荧光视野图片。B: 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中 *CSN4* 干扰后的 mRNA 的相对表达水平变化。 t 检验方法分析差异具有统计学意义, ***表示 $P < 0.001$, 存在极显著差异。C: MDA-MB-231 细胞中慢病毒介导的 *CSN4* 干扰表达后的 *CSN4* 蛋白的表达水平。β-actin 蛋白为内参。

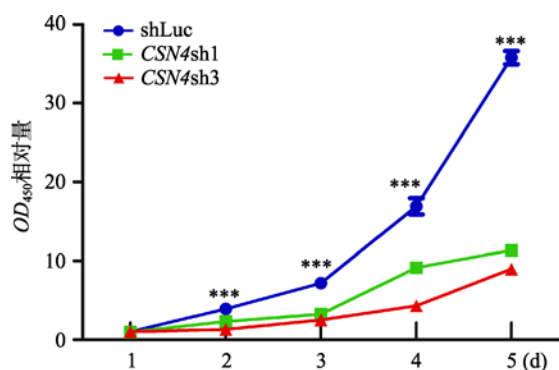


图 2 CCK8 试剂盒检测 *CSN4* 表达干扰对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig. 2 *CSN4* knockdown regulates proliferation of MDA-MB-231 cells as detected by CCK8 Kits

各组细胞在 CCK8 细胞增殖实验中 450 nm 处的平均吸光值 \pm SD ($n=6$), 代表细胞相对的增殖能力。两组干扰组(*CSN4sh1* 和 *CSN4sh3*)与对照组相比差异均具有统计学意义, ***表示 $P<0.001$, 存在极显著差异。

克隆形成能力, 进一步证明 *CSN4* 对于乳腺癌细胞的增殖起到很重要的作用。

2.4 *CSN4* 表达干扰对于 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

将 *CSN4* 干扰表达实验组和 shLuc 对照组的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞进行 PI 染色后用流式细胞仪检测 Sub G₁ 期比例, 结果显示, *CSN4* 干扰表达实验组的 Sub G₁ 期细胞比例相较于 shLuc 对照组显

著增加, *CSN4sh3* 组细胞相比对照组 shLuc 细胞上调近 50%, 统计分析表明两者差异极显著($P<0.001$), 具有统计学意义(图 4, A 和 B)。这表明在乳腺癌细胞中干扰 *CSN4* 的表达会明显增加细胞凋亡的比例。

同时, 将 *CSN4* 干扰实验组和对照组 shLuc 的乳腺癌细胞进行 Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡试剂盒检测。结果显示, 在 MDA-MB-231 细胞中, 当 *CSN4* 的表达被干扰后, 与对照组相比, 早期凋亡的细胞(右下象限)和晚期凋亡细胞(右上象限)都有显著性增加(图 4C), 统计分析表明差异极其显著($P<0.001$)。这进一步证明 *CSN4* 基因在乳腺癌细胞凋亡过程中起到很关键的作用。

2.5 *CSN4* 表达干扰对于 MDA-MB-231 细胞中 CDK6 和 Caspase3 蛋白表达的影响

上述研究结果表明, *CSN4* 的干扰表达能够影响乳腺癌细胞的增殖和凋亡。进一步利用显微镜观察到 *CSN4* 干扰表达的实验组乳腺癌细胞会发生大量死亡的现象, 细胞状态明显变差, 细胞皱缩, 有漂浮现象; 而对照组细胞状态较好, 细胞舒展, 形态正常(图 5A)。

对照组慢病毒和 *CSN4* 干扰组慢病毒感染后, 分别抽提慢病毒感染后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的总蛋白, Western blot 检测 *CSN4* 被干扰后的 Caspase3、CDK6 和 PARP 的蛋白表达水平。结果表明,

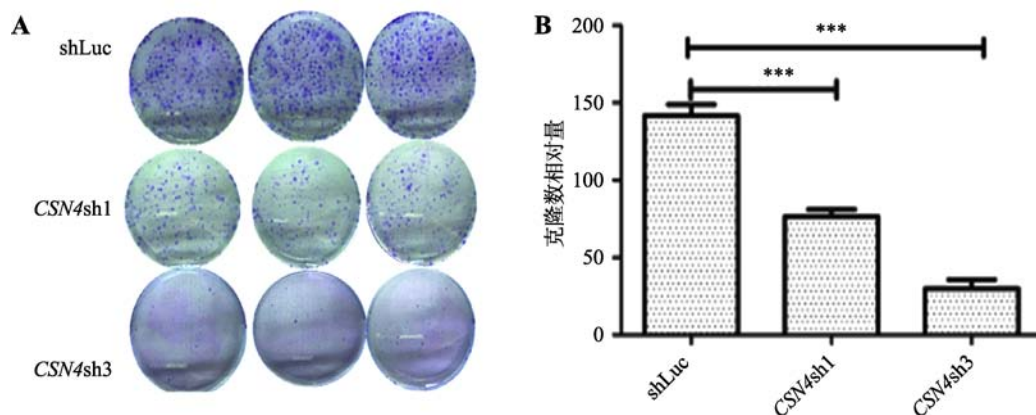


图 3 *CSN4* 表达干扰对于 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 3 Effects of *CSN4* knockdown on colony formation ability of MDA-MB-231 cells

A: *CSN4* 干扰组和对照组的慢病毒感染 MDA-MB-231 形成的细胞克隆对比。B: 重复 3 次实验的统计分析结果。***表示 $P<0.001$, 存在极显著差异。

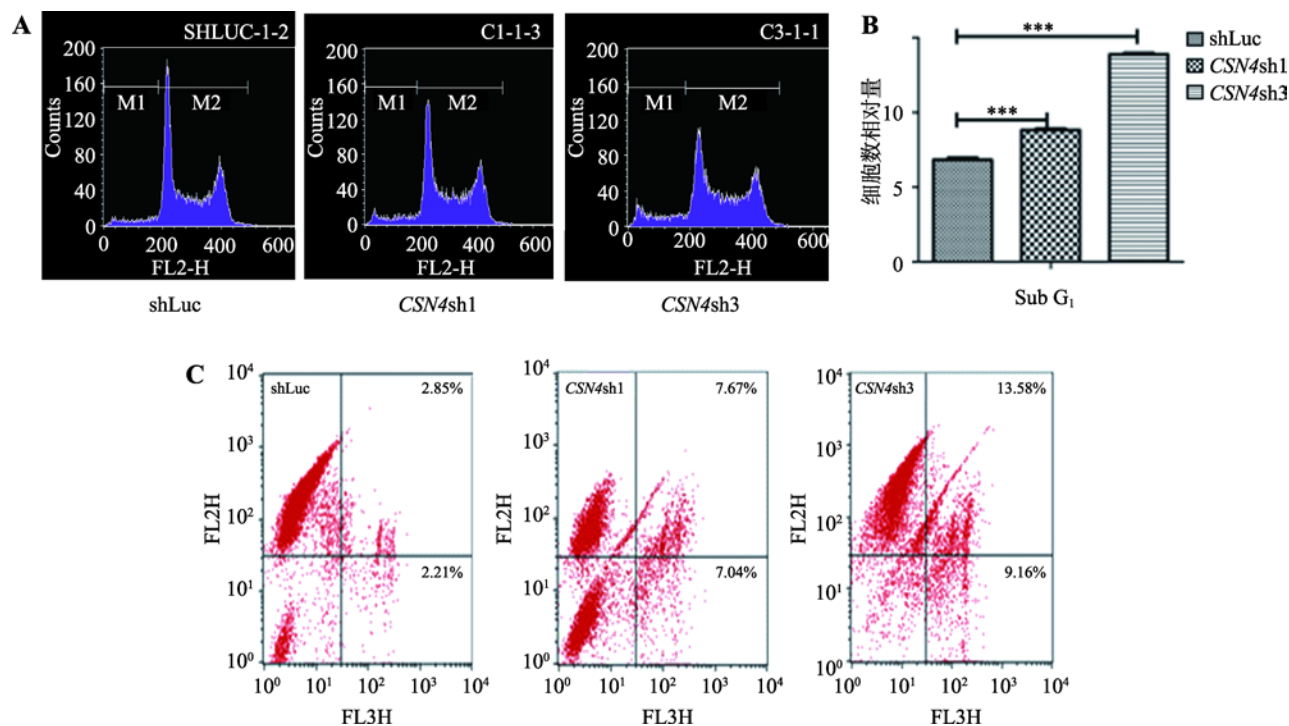


图 4 流式细胞仪测定 *CSN4* 表达干扰对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of *CSN4* knockdown on apoptosis as detected by flow cytometry

A: *CSN4* 干扰表达后 MDA-MB-231 细胞 Sub G₁ 期比例检测。B: 重复 3 次实验的统计分析结果。*t* 检验结果表明差异极显著(***表示 $P < 0.001$), 具有统计学意义。C: Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡试剂盒检测结果。在每组 4 个象限中, 左上: 死亡细胞; 右上: 晚期凋亡细胞; 左下: 正常细胞; 右下: 早期凋亡细胞。

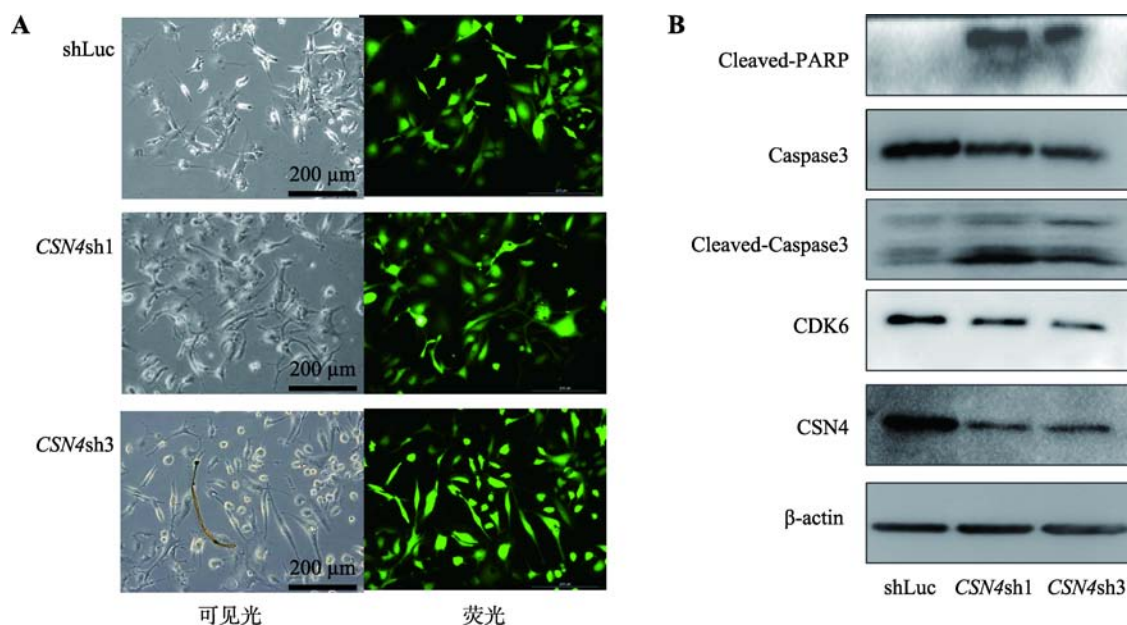


图 5 *CSN4* 表达干扰对 MDA-MB-231 细胞中 CDK6 和 Caspase3 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of *CSN4* knockdown on CDK6 and Caspase3 protein levels in MDA-MB-231 cells

A: 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞荧光拍摄图。左侧为可见光视野, 右侧为荧光视野; B: Western blot 检测不同实验组细胞中 *CSN4*、CDK6 和 Caspase3 蛋白的表达水平。β-actin 为内参。

通过慢病毒感染干扰细胞内 CSN4 蛋白的表达,即 CSN4 的蛋白表达水平下降后,同时检测的 CDK6 蛋白表达的水平发生了显著的下调(图 5B)。这说明干扰 CSN4 的表达能够引起乳腺癌细胞 关键性周期蛋白 CDK6 表达量发生变化。同时,干扰细胞内 CSN4 蛋白表达水平后,Caspase3 总蛋白的表达水平发生了下调,而被剪切的 cleaved-caspase3 蛋白量发生上调,被剪切的 PARP 蛋白出现上调,表明 Caspase3 被激活,作用于其底物 PARP,将 PARP 剪切,剪切的 PARP 蛋白出现显著上调。上述结果充分说明干扰 CSN4 蛋白的表达后,Caspase3 的信号通路被激活。

3 讨论

三阴性乳腺癌的恶性程度较高,表现在侵袭性强、易远处转移以及预后较差。采用内分泌治疗及靶向治疗的方式均对其没有明显的效果。目前,化疗是 TNBC 乳腺癌患者的主要治疗手段,但是 TNBC 的治疗后存活率依然很低。由于缺乏特定的分子靶点,TNBC 的诊断和治疗都受到极大的挑战。因此亟需探索 TNBC 的肿瘤分子生物学机制,寻找有效生物分子靶点,为临床诊断以及治疗发挥作用。

目前的研究表明,CSN4 作为 COP9 复合体中的一个亚基,对整个复合体的稳定性以及复合体的其他亚基都具有重要的调节作用^[26]。而且有报道称 CSN4 基因能够调控 CSN5 蛋白水平从而影响 sGC1 和 p53 的表达水平,并且能够影响肿瘤细胞的增殖和迁移^[25]。根据 COP9 复合体的重要性,以及 CSN4 在 COP9 复合体的结构,提示 CSN4 是 COP9 复合体的重要成员,但是 CSN4 基因在肿瘤的发生发展中的功能与分子机制研究较少,尚没有文献报道 CSN4 基因在乳腺癌细胞中的功能研究以及对细胞凋亡方面的调控的具体机制。

为探索 CSN4 的表达在乳腺癌细胞的主要生物学功能,本研究利用慢病毒感染的方法在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 构建了稳定的干扰 CSN4 表达的体系。通过 CCK-8 和克隆形成实验,结果显示干扰 CSN4 基因可以抑制乳腺癌细胞的生长增殖和克隆形成能力。通过流式细胞仪检测和凋亡试剂盒检测

表明干扰 CSN4 的表达能够显著增加细胞凋亡的比例,可诱导细胞进入凋亡。研究结果为深入揭示 CSN4 在乳腺癌细胞中的分子机制打下了基础,同时也具有一定的临床应用潜力。

本研究中,干扰 CSN4 基因可以抑制乳腺癌细胞的生长增殖和克隆形成能力,同时检测出细胞周期相关蛋白 CDK6,干扰 CSN4 基因的表达能够引起 CDK6 的蛋白表达水平下调,CDK6 是细胞周期的重要调控因子,主要促进细胞周期由 G₁ 期进展到 S 期。细胞周期的失控是人类肿瘤发生的主要原因之一^[27-29],揭示干扰 CSN4 基因可能导致乳腺癌的细胞周期发生异常,从而导致细胞生长阻滞,甚至发生凋亡现象。

已有研究报道,COP9 复合体主要是以 Caspases 依赖性形式影响细胞凋亡^[30]。为进一步探索 CSN4 基因是如何促进细胞凋亡,通过 Western blot 检测干扰 CSN4 基因后导致细胞的细胞凋亡基因 Caspase3 的前体蛋白总量表达下调,而被活化的 cleaved-Caspase3 的蛋白量明显上调,继而又同时检测出被剪切的 PARP 的蛋白表达水平也上调,因此推测 CSN4 基因可能是直接或间接激活 Caspase3 的活性进而引起乳腺癌细胞的凋亡。CSN4 作为 COP9 复合体的一员,其对复合体的稳定性调节起到很关键的作用。在 COP9 复合体中,尤其是 CSN5,已经有很多研究表明 CSN5 在细胞凋亡中发挥重要的作用。在胚胎细胞中 CSN5 敲除可诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖,上调 p27、p53 和细胞周期蛋白 E^[31]。除了 CSN5 外,COP9 复合体的其他亚基也被报道与凋亡有关。有研究表明^[32],CSN6 能够被 caspase8 剪切,从而影响 CSN 复合物的完整性,继而在凋亡级联反应过程中影响 CSN 复合物的活性。在肺癌和肝癌细胞中,敲低 CSN3 能够提高细胞凋亡水平^[33,34]。CSN8 在肝癌细胞中敲除后,同样也会引起细胞发生大量凋亡现象,导致促凋亡因子 Bax,抗凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-x1 发生异常表达^[33]。而且还有研究显示^[34],CSN1 能够在紫外线照射处理下诱导细胞发生凋亡。在 K562 细胞系中敲低 CSN2 或者 CSN5,会导致不同的细胞模式死亡,分别是自噬或者细胞凋亡^[35]。综上所述,COP9 复合物在细胞凋亡过程中发挥重要作用。目前 CSN4 有可能是作为单体独立发挥作用

于肿瘤细胞从而促进细胞凋亡, 同时也有可能是与复合体其他亚基相互作用影响复合体的稳定性, 从而影响其他亚基的表达。但是至于 *CSN4* 是作为单体还是复合亚基发挥作用, 目前尚不清楚, 且相关文献报道较少。因此, 未来需要更进一步的探索 *CSN4* 的分子机制。

综上所述, 本研究在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中建立了 *CSN4* 稳定干扰表达系统, 探索了 *CSN4* 基因对乳腺癌细胞的增殖能力和凋亡造成的影响, 以及进一步研究了干扰 *CSN4* 的表达在乳腺癌细胞发生凋亡的分子机制。但是, *CSN4* 是如何通过 Caspase3 调控细胞具体凋亡的分子机制尚不清楚, 仍有待进一步的研究去揭示。

参考文献(References):

- [1] Bhoi AK, Das SK, Majhi D, Sahu PK, Nijamudheen A, N A, Rahaman A, Sarkar M. Analyte interactions with a new ditopic dansylamide-nitrobenzoxadiazole dyad: a combined photophysical, NMR, and theoretical (DFT) study. *J Phys Chem B*, 2014, 118(33): 9926–9937. [DOI]
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu XQ, He J. Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115–132. [DOI]
- [3] Corbex M, Bouzbid S, Traverse-Glehen A, Aouras H, McKay-Chopin S, Carreira C, Lankar A, Tommasino A, Gheit T. Prevalence of papillomaviruses, polyomaviruses, and herpesviruses in triple-negative and inflammatory breast tumors from algeria compared with other types of breast cancer tumors. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114559. [DOI]
- [4] Maytal-Kivity V, Pick E, Piran R, Hofmann K, Glickman MH. The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(5): 706–715. [DOI]
- [5] Rajan KE, Rajkumar R, Liao CC, Ganesh A, Marimuthu G. Light-induced COP9 signalosome expression in the Indian false vampire bat *Megaderma lyra*. *J Physiol Sci*, 2010, 60(1): 43–49. [DOI]
- [6] Dubiel D, Rockel B, Naumann M, Dubiel W. Diversity of COP9 signalosome structures and functional consequences. *FEBS Lett*, 2015, 589(19 Pt A): 2507–2513. [DOI]
- [7] Lingaraju GM, Bunker RD, Cavadini S, Hess D, Hassiepen U, Renayus M, Fischer ES, Thomä NH. Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature*, 2014, 512(7513): 161–165. [DOI]
- [8] Emberley ED, Mosadeghi R, Deshaies RJ. Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylated SCF by a noncatalytic mechanism. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29679–29689. [DOI]
- [9] Yu YS, Tang ZH, Pan QC, Chen XH, Liu XN, Zang GQ. Inhibition of *CSN3* expression induces growth arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Chemoth Pharm*, 2012, 69(5): 1173–1180. [DOI]
- [10] Wang XM, Cui JW, Li W, Cai L, Song W, Wang GJ. Silencing of the *COPS3* gene by siRNA reduces proliferation of lung cancer cells most likely via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Asian Pac J Cancer P*, 2012, 13(3): 1043–1048. [DOI]
- [11] Zhao R, Yeung SC, Chen J, Iwakuma T, Su CH, Chen B, Qu C, Zhang F, Chen YT, Lin YL, Lee DF, Jin F, Zhu R, Shaikenov T, Sarbassov D, Sahin A, Wang H, Wang H, Lai CC, Tsai FJ, Lozano G, Lee MH. Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers. *J Clin Invest*, 2011, 121(2): 851–865. [DOI]
- [12] Zhang XC, Chen J, Su CH, Yang HY, Lee MH. Roles for *CSN5* in control of p53/MDM2 activities. *J Cell Biochem*, 2008, 103(4): 1219–1230. [DOI]
- [13] Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, 1999, 398(6723): 160–165. [DOI]
- [14] Yang X, Menon S, Lykke-Andersen K, Tsuge T, Di Xiao, Wang X, Rodriguez-Suarez RJ, Zhang H, Wei N. The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. *Curr Biol*, 2002, 12(8): 667–672. [DOI]
- [15] Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *Embo J*, 2001, 20(7): 1630–1639. [DOI]
- [16] Kim BC, Lee HJ, Park SH, Lee SR, Karpova TS, McNally JG, Felici A, Lee DK, Kim SJ. Jab1/*CSN5*, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(6): 2251–2262. [DOI]
- [17] Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, Barrette TR, Anstet MJ,

- Kincead-Beal C, Kulkarni P, Varambally S, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 166–180. [DOI]
- [18] Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Barrette TR, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome. *Nat Genet*, 2005, 37(6): 579–583. [DOI]
- [19] Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*, 2004, 6(1): 1–6. [DOI]
- [20] Pollmann C, Huang X, Mall J, Bech-Otschir D, Naumann M, Dubiel W. The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8416–8421. [DOI]
- [21] Kob R, Kelm J, Posorski N, Baniahmad A, von Eggeling F, Melle C. Regulation of the anaphase-promoting complex by the COP9 signalosome. *Cell Cycle*, 2009, 8(13): 2041–2049. [DOI]
- [22] Leal JF, Fominaya J, Cascón A, Guijarro MV, Blanco-Aparicio C, Lleónart M, Castro ME, Ramon Y Cajal S, Robledo M, Beach DH, Carnero A. Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene*, 2008, 27(14): 1961–1970. [DOI]
- [23] Boutonnet C, Tanguay PL, Julien C, Rodier G, Coulombe P, Meloche S. Phosphorylation of Ser72 does not regulate the ubiquitin ligase activity and subcellular localization of Skp2. *Cell Cycle*, 2010, 9(5): 975–979. [DOI]
- [24] Bashir T, Pagan JK, Busino L, Pagano M. Phosphorylation of Ser72 is dispensable for Skp2 assembly into an active SCF ubiquitin ligase and its subcellular localization. *Cell Cycle*, 2010, 9(5): 971–974. [DOI]
- [25] Bhansali M, Shemshedini L. COP9 subunits 4 and 5 target soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ and p53 in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(6): 834–845. [DOI]
- [26] Lingaraju GM, Bunker RD, Cavadini S, Hess D, Hassiepen U, Renatus M, Fischer ES, Thomä NH. Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature*, 2014, 512(7513): 161–165. [DOI]
- [27] Kollmann K, Heller G, Schneckenleithner C, Warsch W, Scheicher R, Ott RG, Schäfer M, Fajmann S, Schleder M, Schiefer AI, Reichart U, Mayerhofer M, Hoeller C, Zöchbauer-Müller S, Kerjaschki D, Bock C, Kenner L, Hoefler G, Freissmuth M, Green AR, Moriggl R, Busslinger M, Malumbres M, Sexl V. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 2016, 30(2): 359–360. [DOI]
- [28] Thomas JW, Lee-Lin SQ, Green ED. Human-mouse comparative mapping of the genomic region containing CDK6: localization of an evolutionary breakpoint. *Mamm Genome*, 1999, 10(7): 764–767. [DOI]
- [29] Schulze-Gahmen U, Kim SH. Structural basis for CDK6 activation by a virus-encoded cyclin. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(3): 177–181. [DOI]
- [30] Hetfeld BK, Peth A, Sun XM, Henklein P, Cohen GM, Dubiel W. The COP9 signalosome-mediated deneddylation is stimulated by caspases during apoptosis. *Apoptosis*, 2008, 13(2): 187–195. [DOI]
- [31] Sang MM, Du WQ, Zhang RY, Zhang JN, Pei DS. Suppression of CSN5 promotes the apoptosis of gastric cancer cells through regulating p53-related apoptotic pathways. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(15): 2897–2901. [DOI]
- [32] da Silva Correia J, Miranda Y, Leonard N, Ulevitch RJ. The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem*, 2007, 282(17): 12557–12565. [DOI]
- [33] Lei D, Li F, Su H, Liu J, Wei N. Hepatic deficiency of COP9 signalosome subunit 8 induces ubiquitin-proteasome system impairment and Bim-mediated apoptosis in murine livers. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67793. [DOI]
- [34] Dubois EL, Gerber S, Kisselev A, Harel-Bellan A, Groisman R. UV-dependent phosphorylation of COP9/signalosome in UV-induced apoptosis. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 3101–3105. [DOI]
- [35] Akiyama H, Fujisawa N, Tashiro Y, Takanabe N, Sugiyama A, Tashiro F. The role of transcriptional corepressor Nif3l1 in early stage of neural differentiation via cooperation with Trip15/CSN2. *J Biol Chem*, 2003, 278(12): 10752–10762. [DOI]