

RRS1 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及其作用机制

吴清兰¹ 邓林¹ 孙文静¹ 张丽² 张金平³ 侯琳¹

(1 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071; 2 青岛大学药学院;

3 中国人民解放军海军第 971 医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨核糖体合成调控因子 1 (RRS1) 基因对乳腺癌 BT549 细胞增殖和迁移的影响及其作用机制。**方法** 通过 Western Blot 实验检测人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT549、MCF-7 细胞) 和人正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞 RRS1 蛋白的表达量。通过免疫荧光检测 RRS1 在 BT549 细胞中的定位。慢病毒感染法建立 RRS1 敲低的 BT549 细胞系, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western Blot 实验检测感染阴性对照慢病毒细胞 (Con 组) 和感染 shRNA-RRS1 慢病毒细胞 (sh-RRS1 组) 中 RRS1 mRNA 和蛋白相对表达量。采用 CCK8 实验和集落形成实验检测 RRS1 对 BT549 细胞增殖能力的影响, 通过细胞划痕实验、Transwell 实验检测 RRS1 对 BT549 细胞迁移能力的影响。采用 Western Blot 实验检测两组细胞 AKT-mTOR 相关信号通路蛋白及其下游缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 蛋白、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白相对表达量。**结果** MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT549、MCF-7 乳腺癌细胞系中 RRS1 相对表达量与人正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞相比均显著增高 ($F=48.92, P<0.05$)。免疫荧光染色显示, RRS1 主要在 BT549 细胞的细胞核和核仁表达, 细胞质也有少量表达。与 Con 组进行比较, sh-RRS1 组 RRS1 mRNA 和蛋白表达量显著降低, 增殖和迁移能力均明显减弱, p-AKT、p-mTOR、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量均显著降低 ($t=6.29\sim 32.04, F=1\ 368.00, 2\ 699.00, P<0.05$)。**结论** RRS1 可能通过 AKT-mTOR 通路促进乳腺癌细胞的增殖和迁移。

[关键词] 乳腺肿瘤; 核糖体合成调控因子 1; 细胞系, 肿瘤; 基因表达调控; 细胞运动; 细胞增殖

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

EFFECT OF REGULATOR OF RIBOSOME SYNTHESIS 1 ON THE PROLIFERATION AND MIGRATION OF BREAST CANCER CELLS AND ITS MECHANISM OF ACTION

WU Qinglan, DENG Lin, SUN Wenjing, ZHANG Li, ZHANG Jinping, HOU Lin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of the regulator of ribosome synthesis 1 (RRS1) gene on the proliferation and migration of breast cancer BT549 cells and its mechanism of action. **Methods** Western blot was used to measure the protein expression of RRS1 in human breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549, and MCF-7 cells) and normal human breast epithelial MCF-10A cells, and immunofluorescence assay was used to observe the localization of RRS1 in BT549 cells. The lentivirus infection method was used to establish an RRS1-knockdown BT549 cell line, and quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the relative mRNA and protein expression levels of RRS1 in the Con group transfected with negative control lentivirus and the sh-RRS1 group transfected with shRNA-RRS1 lentivirus. CCK8 assay and colony-forming assay were used to observe the effect of RRS1 on the proliferation ability of BT549 cells, and wound healing assay and Transwell assay were used to observe the effect of RRS1 on the migration ability of BT549 cells. Western blot was used to measure the relative expression levels of AKT-mTOR signaling pathway proteins and their downstream proteins hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the two groups. **Results** The relative expression level of RRS1 in breast cancer cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT549, and MCF-7 was significantly higher than that in normal human breast epithelial MCF-10A cells ($F=48.92, P<0.05$). Immunofluorescent staining showed that RRS1 was mainly expressed in the nucleus and nucleolus of BT549 cells, with a low expression level in the cytoplasm. Compared with the Con group, the sh-RRS1 group had significant reductions in the mRNA and protein expression levels of RRS1, the proliferation and migration abilities of cells, and the protein expression levels of p-AKT, p-mTOR, HIF-1 α , and VEGF ($t=6.29-32.04, F=1\ 368.00, 2\ 699.00, P<0.05$). **Conclusion** RRS1 may promote the proliferation and migration of breast cancer cells through the AKT-mTOR pathway.

[KEY WORDS] Breast neoplasms; Regulator of ribosome synthesis 1; Cell line, tumor; Gene expression regulation; Cell movement; Cell proliferation

[收稿日期] 2023-03-11; **[修订日期]** 2023-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81472542); 山东省重点研发项目 (2019GSF107025); 山东省科技卫生发展计划项目 (202102021147); 山东省中医药科技项目 (2021Z196)

[通讯作者] 侯琳, Email: qingyi001@126.com; 张金平, Email: tq0060w@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率正在逐年上升, 严重威胁着女性的生命健康^[1]。尽管在诊断和治疗方面取得了进步, 但是乳腺癌患者的复发率和死亡率仍然很高^[2]。因此,

需要更全面地了解乳腺癌发生和进展的潜在机制,以确定乳腺癌特异性的生物标志物以及治疗靶点,改善乳腺癌的治疗效果。核糖体合成调控因子 1 (RRS1)最早在酵母中被发现,由 203 个氨基酸组成,也是真核生物的保守蛋白^[3]。RRS1 在核糖体生物发生中扮演重要的角色,此外,RRS1 还与细胞有丝分裂、端粒聚集以及染色体重排密切相关^[3]。RRS1 基因的异常表达会导致核糖体功能障碍,进一步影响蛋白质的合成。近几年,多项研究表明 RRS1 在肝细胞癌^[4]、结直肠癌^[5]、宫颈癌^[6]以及胃癌^[7]等多种恶性肿瘤中过表达,提示其可能作为癌基因促进肿瘤生长和转移。本课题组前期研究发现 RRS1 在乳腺癌中高表达,RRS1 可以通过 RPL11/MDM2/p53 信号传导促进乳腺癌细胞的增殖^[8-9]。另外有研究结果显示,RRS1 基因可以通过 RPL11/c-Myc/SNAIL 轴调节人类乳腺癌细胞的侵袭和转移^[10]。由此可见,RRS1 与乳腺癌的发生及进展密切相关,但 RRS1 在乳腺癌中的作用及其机制尚不明确,相关方面的报道也甚少。本研究通过观察敲降 RRS1 基因对乳腺癌 BT549 细胞增殖和迁移的影响,探讨 RRS1 在乳腺癌发生和进展中的潜在机制,以期能够为乳腺癌的诊断和治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞系 MDA-MB-231、MCF-10A、MDA-MB-468、BT-549 和 MCF-7 均购自中国科学院(昆明)细胞库。CCK8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,RRS1、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 抗体购买于英国 Abcam 公司,缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)以及 GAPDH、血管内皮生长因子(VEGF)抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,Trizol Reagent、RNA 定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,RRS1 敲降慢病毒购自上海吉凯基因医学科技有限公司。

1.2 细胞培养

MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT549、MCF-7 和 MCF-10A 细胞置于含体积分数 0.10 的胎牛血清和青链霉素混合溶液(100 mg/L 链霉素、100 mg/L 青霉素)的 DMEM 培养基中,在 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 条件下进行培养,根据细胞生长状态换液传代,培养两代后,可进行细胞冻存及后续实验。

1.3 免疫荧光检测 RRS1 在 BT549 细胞中的定位

取生长状态良好的 BT549 细胞,接种于铺有细

胞爬片的 24 孔板中,待细胞贴壁且形态完全舒展时,以 40 g/L 甲醛固定 20 min,继而以 2 g/L 的 Triton X-100 透化 10 min,然后加入 200 μ L 即用型山羊血清,室温孵育 30 min,PBST 洗涤细胞 3 次。然后将细胞与 RRS1(1:200 稀释)一抗在 4 °C 下孵育过夜,第 2 天,加入相应种属的荧光二抗,室温孵育 1 h,PBST 洗涤细胞 3 次,后置于暗室室温下用 DAPI 染色 5 min,PBST 洗涤 3 次,将爬片取出,用封片剂固定在载玻片上,在共聚焦显微镜下拍照。

1.4 慢病毒感染 BT549 细胞

取生长状态良好的 BT549 细胞,接种到 6 孔板(约 1.5×10^5 个细胞/孔),当细胞汇合度达 30%时,分别感染阴性对照慢病毒(Con 组)以及 shRNA-RRS1 慢病毒(sh-RRS1 组),根据细胞的病毒感染复数值计算需要加入的病毒体积,将适量的病毒以及转染试剂与 1 mL 的无血清 DMEM 培养基混匀,加入 6 孔板中,感染 8~16 h 后,更换为完全培养基继续培养。感染 72 h 以后,于倒置荧光显微镜下观察细胞荧光强度,当荧光强度达 70%以上时进行后续实验。

1.5 Western Blot 实验检测细胞中 RRS1 蛋白表达量

当稳定生长的 MDA-MB-468、MCF-7、BT-549、MDA-MB-231、MCF-10A 细胞及慢病毒感染的两组 BT549 细胞融合度达到 80%~90%,吸弃原培养基,用 PBS 冲洗 2 次。加入含有 10 g/L 蛋白酶抑制剂和 10 g/L 磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液,在冰浴中裂解细胞 30 min,收集细胞裂解液,用 BCA 法检测蛋白浓度。将裂解得到的蛋白样品加入适量的蛋白上样缓冲液进行蛋白变性,根据蛋白浓度计算上样体积。用含体积分数 0.10 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,恒压 80 V 直至各孔样本穿过浓缩胶,然后调整为恒压 120 V 继续电泳。直至指示剂迁移至凝胶底部,然后 300 mA 恒流下将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,并在 4 °C 下与一抗孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后放置摇床上常温孵育二抗 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 ELC 显色液显影拍照。以 GAPDH 为内参,使用 Image J 软件计算目的蛋白相对表达量。

1.6 RT-qPCR 检测细胞中 RRS1 mRNA 的表达

使用 Trizol 试剂提取稳定感染的 Con 组和 sh-RRS1 组细胞总 RNA,检测并调整浓度,确保两组浓度一致,每次反应使用 1 μ g 总 RNA,通过反转录

合成第一链 cDNA,按照试剂说明书要求进行 RT-qPCR,以 GAPDH 基因为内参,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 RRS1 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物名称及其序列

引物名称	序列	长度 (bp)
RRS1	F:5'-CCCTACCGACACCAGAGTAA-3'	21
	R:5'-CCGAAAAGGGGTTGAAACTTCC-3'	22
GAPDH	F:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	20
	R:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	20

1.7 CCK8 实验检测细胞的增殖能力

将 Con 组和 sh-RRS1 组细胞,接种到 96 孔板(约 2×10^3 个细胞/孔)。分别于接种后第 1、2、3、4、5 天的 10:00,将 10 μ L CCK8 试剂与 90 μ L 培养基混合,加入到有细胞的每个孔中,继续孵育 2 h,并使用酶标仪在波长 450 nm 处检测各组细胞的吸光度值。

1.8 集落形成实验检测细胞的增殖能力

将 Con 组和 sh-RRS1 组细胞,分别接种于 6 孔板(约 1×10^3 个细胞/孔),每 2~3 d 根据细胞状态进行换液培养。培养 14 d 或每个克隆均包含 50 个细胞以上时,菌落用 40 g/L 甲醛固定,PBS 冲洗 2 次,然后向每个孔中加入 5 g/L 的结晶紫 500 μ L 染色 30 min。用 PBS 洗净后自然晾干,拍照并进行计数分析。

1.9 细胞划痕实验检测细胞的迁移能力

将 Con 组和 sh-RRS1 组细胞,分别接种于 6 孔板中(约 2×10^5 个细胞/孔),待细胞融合度达 90% 以上且细胞为单层状态后,使用 200 μ L 移液器吸头稍微刮擦单层,形成均匀的无细胞伤口区域,向每孔中加入 2 mL 无血清培养基,分别在培养第 0、12、24 小时时用倒置显微镜拍照,计算第 24 小时时细胞迁移情况。

1.10 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力

将 Con 组和 sh-RRS1 组细胞以每孔约 2×10^5 个细胞接种至小室中,加入含 30 μ L 基质凝胶(1:8 稀释)的无血清培养基,并且确保小室的终体积为 200 μ L,下室加入 600 μ L 含体积分数 0.15 血清的培养基,培养 24~48 h 后,用棉签擦去小室内的细胞,并将底部的侵袭细胞固定染色,用 PBS 清洗后自然晾干,在光学显微镜下成像并计数。

1.11 Western Blot 实验检测细胞中 AKT-mTOR 相关信号通路蛋白的表达量

当 Con 组和 sh-RRS1 组培养的细胞融合度达

到 80%~90% 时,吸弃原培养基,用 PBS 冲洗 2 次,用 RIPA 缓冲液裂解两组细胞的总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。采用 Western Blot 方法检测两组细胞中 AKT、m-TOR、p-AKT、p-mTOR、VEGF 以及 HIF-1 α 蛋白的相对表达量,实验步骤同 1.5。以 GAPDH 为内参蛋白计算目的蛋白的相对表达量。

1.12 统计学处理

采用 Graphpad Prism 8 软件对数据进行统计分析。所有实验均重复 3 次,结果取均值。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。多组不同时间的比较采用重复测量设计的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌细胞系中 RRS1 表达量比较

Western Blot 实验的结果显示,正常 MCF-10A 与乳腺癌细胞系 MDA-MB-468、MCF-7、MDA-MB-231、BT549 细胞中的 RRS1 蛋白相对表达量分别为 0.27 ± 0.07 、 0.79 ± 0.03 、 1.22 ± 0.06 、 1.05 ± 0.06 、 1.28 ± 0.10 。各组间比较差异有显著性($F = 48.92$, $P < 0.05$),其中 4 种乳腺癌细胞系中 RRS1 表达量显著高于 MCF-10A 细胞系($P < 0.05$),4 种乳腺癌细胞系之间比较差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 RRS1 在 BT549 细胞中的定位

免疫荧光染色显示,RRS1 主要在 BT549 细胞的细胞核和核仁表达,细胞质也有少量表达。见图 1。图中绿色荧光染色的为 RRS1。

2.3 慢病毒感染 BT549 细胞后 RRS1 表达量比较

Con 组细胞中 RRS1 mRNA 和蛋白的相对表达量分别为 1.01 ± 0.01 、 0.91 ± 0.04 ,sh-RRS1 组分别为 0.27 ± 0.04 、 0.51 ± 0.02 。两组细胞中 RRS1 mRNA 和蛋白表达量比较差异均具有显著性($t = 32.04$ 、 15.09 , $P < 0.05$)。证明 RRS1 敲降成功。

2.4 RRS1 对 BT549 细胞增殖能力的影响

实验结果显示,时间、组别以及时间组别交互作用对细胞增殖能力均具有显著影响($F_{\text{时间}} = 497.30$, $F_{\text{组别}} = 3\ 341.00$, $F_{\text{交互}} = 66.87$, $P < 0.05$)。单独效应分析显示,两组细胞不同时间点细胞增殖能力比较差异具有显著性($F = 458.40$ 、 323.00 , $P < 0.05$),其中,与第 1 天相比,Con 组和 sh-RRS1 组细胞其他时间点细胞增殖能力均明显增强($P < 0.05$);与 Con 组相比,sh-RRS1 组细胞在第 4、5 天的增殖能力明显减弱($F = 1\ 368.00$ 、 $2\ 699.00$, $P < 0.05$),见

表 2。集落形成实验结果显示,Con 组和 sh-RRS1 组集落形成数目分别为 60.00 ± 3.00 、 29.00 ± 3.00 , 两组相比较差异均具有统计学意义($t = 14.86, P < 0.05$)。

2.5 RRS1 对 BT549 细胞迁移和侵袭能力的影响

细胞划痕实验结果显示,Con 组和 sh-RRS1 组细胞从 0 h 至 24 h 的迁移率分别为 0.48 ± 0.05 、 0.19 ± 0.02 , 两组细胞的迁移能力比较差异具有显著性($t = 9.06, P < 0.05$)。Transwell 实验结果显

示,Con 组和 sh-RRS1 组细胞迁移通过小室的数目分别为 103.33 ± 7.09 、 29.67 ± 7.63 , 两组细胞迁移通过小室的数目比较差异具有显著性($t = 12.24, P < 0.05$)。见图 2。

表 2 两组细胞的细胞增殖能力比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
Con 组	0.22 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.82 ± 0.03	1.10 ± 0.06	1.37 ± 0.06
sh-RRS1 组	0.22 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.77 ± 0.03

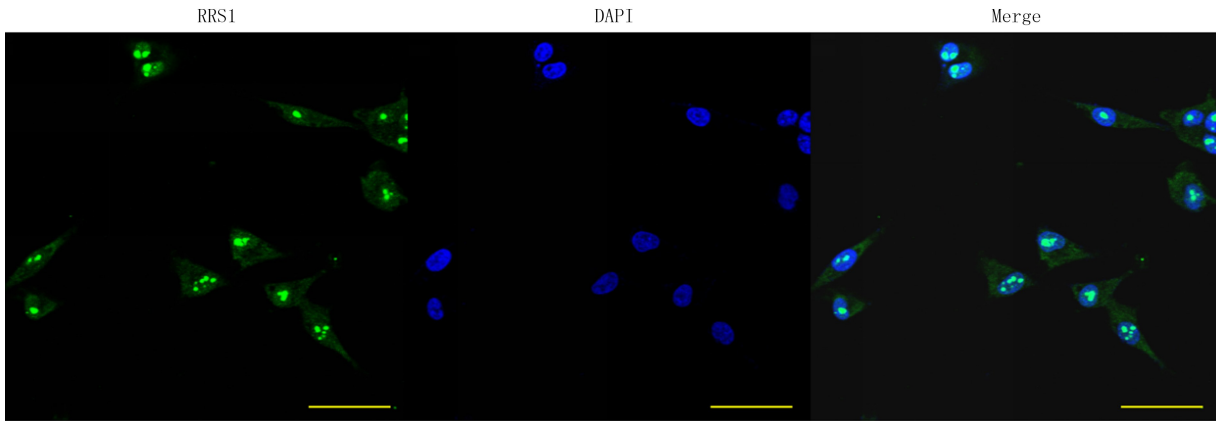
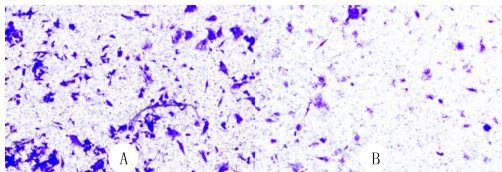


图 1 RRS1 在 BT549 细胞中的定位(免疫荧光染色,400 倍)



A: Con 组, B: sh-RRS1 组; 结晶紫染色, 200 倍

图 2 两组细胞侵袭能力比较

表 3 两组细胞中 AKT-m-TOR 通路相关蛋白的表达量比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	AKT	p-AKT	mTOR	p-mTOR	VEGF	HIF-1 α
Con 组	1.06 ± 0.06	1.20 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.70 ± 0.07	1.03 ± 0.11	1.19 ± 0.08
sh-RRS1 组	1.09 ± 0.05	0.63 ± 0.03	1.09 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.70 ± 0.03

2.6 RRS1 对侵袭和迁移相关蛋白表达的影响

Western Blot 实验结果显示,与 Con 组相比, sh-RRS1 组细胞中 AKT、mTOR 蛋白相对表达量比较差异无显著性($P > 0.05$), p-AKT、p-mTOR、VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量比较差异均有显著性($t = 6.29 \sim 22.86, P < 0.05$)。见表 3。

3 讨 论

近年来,中国乳腺癌新发病例数呈不断升高趋势^[11], 每年有超过 16.9 万女性患有乳腺癌^[12]。尽管在治疗干预方面取得了一定进展,但大约有 30% 的早期乳腺癌患者会发生转移,5 年相对生存率约为 25%^[13]。乳腺癌转移过程极其复杂,其发病机制尚未阐明。因此,更全面地了解乳腺癌发生和进展的潜在机制,寻找更有效的新的治疗靶点,对提高乳腺癌患者的生存率非常重要^[14]。

RRS1 是核糖体生物发生的调节因子^[3]。人类 RRS1 基因位于染色体 8q13.1 上,仅包含一个外显

子^[3]。RRS1 在核糖体生物合成、赤道板染色体聚集和细胞周期端粒聚集中起重要作用^[15-16]。RRS1 通过促进内质网应激在亨廷顿病的发病机制中起重要作用^[17-18]。近几年,RRS1 基因在肿瘤中的作用逐渐受到关注。GAMBE 等^[15]发现 RRS1 蛋白有助于 HeLa 细胞的染色体聚集。WU 等^[5]发现,在结直肠癌细胞中,敲降 RRS1 基因通过阻滞 G₂/M 期进展和血管生成,进而抑制结直肠癌细胞增殖和肿瘤发生。MA 等^[7]的研究发现在胃癌细胞中敲降 RRS1 基因可诱导凋亡并可抑制细胞增殖、迁移和侵袭。YAN 等^[19]发现在视网膜母细胞瘤细胞中,敲降 RRS1 基因可通过 AKT/mTOR 信号通路促

进细胞的增殖和侵袭。由此可以推测, *RRS1* 基因与肿瘤的发生发展密切相关。本课题组前期利用 TCGA 数据库结合高内涵筛选技术筛选出与乳腺癌细胞增殖和侵袭转移有关的 *RRS1* 基因, 并首次报道了 *RRS1* 在乳腺癌细胞增殖中的作用^[8-9]。但目前关于 *RRS1* 基因与乳腺癌相关研究仍较少。

为了探索 *RRS1* 在乳腺癌细胞中的潜在作用, 本研究首先使用 Western Blot 实验分析比较 *RRS1* 在 MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT549、MCF-7 乳腺癌细胞系和正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞系中的表达量, 结果显示这 4 种乳腺癌细胞系的 *RRS1* 蛋白表达量显著高于正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A。进一步选择 *RRS1* 高表达的 BT549 细胞以求明确 *RRS1* 在乳腺癌细胞中的表达位置。免疫荧光染色显示, *RRS1* 主要在 BT549 细胞的细胞核和核仁表达, 细胞质也有少量表达。为进一步探讨 *RRS1* 基因在乳腺癌细胞中作用机制, 本研究使用 shRNA-*RRS1* 慢病毒感染了 BT549 细胞, RT-qPCR 以及 Western Blot 实验检测慢病毒对 *RRS1* 基因的敲降效果, 结果显示敲降 *RRS1* 基因显著降低了 BT549 细胞 *RRS1* mRNA 和蛋白的表达量。进一步研究显示, 敲降 *RRS1* 抑制了 BT549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这些结果均提示 *RRS1* 在乳腺癌细胞的发生发展中起到了重要作用。

AKT/mTOR 通路是一种经典的信号通路, 对细胞增殖、代谢和运动等调控至关重要^[20]。AKT/mTOR 通路在多种癌症中处于异常的高激活状态, 且与临床的不良预后有关, 在肿瘤细胞转移、血管新生等方面发挥有关键作用^[21-22], 同时其异常激活还会促进乳腺癌细胞的转移和糖酵解, 干预该通路的激活对于乳腺癌治疗提供了新的思路^[23]。因此, 本研究进一步分析了 *RRS1* 对该通路的调控作用, 敲降 *RRS1* 基因不影响 AKT、mTOR 的总蛋白水平, 但可以明显抑制 BT549 细胞 AKT、mTOR 蛋白的磷酸化水平, 提示 *RRS1* 基因很可能直接或间接激活 AKT/mTOR 相关信号通路。血管生成对于恶性肿瘤的生长、转移以及预后均具有极其重要的意义^[24]。HIF-1 α 是调节血管生成的重要因子, 能够促进 VEGF 的表达^[25]。由于 Akt/mTOR 通路是一种调节 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的经典通路, 所以进一步探讨 *RRS1* 是否通过调控 AKT/mTOR 通路影响下游 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达。本研究发现敲降 *RRS1* 基因通过抑制 AKT/mTOR 的激活, 抑制了下游 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达, 进而抑

制了 BT549 细胞的增殖和迁移。

综上所述, *RRS1* 在乳腺癌细胞中高表达, 在细胞核和胞浆都有定位, 敲降 *RRS1* 通过抑制 AKT/mTOR 信号通路及其下游蛋白的表达, 进而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。因此, *RRS1* 可能是乳腺癌潜在的治疗靶点。然而, 该研究仅限于细胞水平, 后续还需要对相关机制进行更深入和更全面的探讨。

作者声明:吴清兰、邓林、张金平、侯琳、孙文静和张丽参与了研究设计; 吴清兰、侯琳和张金平参与了论文的写作及修改。所有作者均阅读并同意发表该论文, 且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7):783-791.
- [2] LIANG Y R, ZHANG H W, SONG X J, et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60:14-27.
- [3] HUA Y N, SONG J L, PENG C X, et al. Advances in the relationship between regulator of ribosome synthesis 1 (*RRS1*) and diseases[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:620925.
- [4] CAO P B, YANG A Q, LI P Y, et al. Genomic gain of *RRS1* promotes hepatocellular carcinoma through reducing the RPL11-MDM2-p53 signaling [J]. Sci Adv, 2021, 7 (35): eabf4304.
- [5] WU X L, YANG Z W, HE L, et al. *RRS1* silencing suppresses colorectal cancer cell proliferation and tumorigenesis by inhibiting G2/M progression and angiogenesis[J]. Oncotarget, 2017, 8(47):82968-82980.
- [6] ZHANG Y, SUN B M, ZHAO L B, et al. Up-regulation of miRNA-148a inhibits proliferation, invasion, and migration while promoting apoptosis of cervical cancer cells by down-regulating *RRS1*[J]. Biosci Rep, 2019, 39(5):BSR20181815.
- [7] MA Y L, YAN F, WEI W J, et al. microRNA-598 inhibits the growth and maintenance of gastric cancer stem-like cells by down-regulating *RRS1* [J]. Cell Cycle, 2019, 18 (20): 2757-2769.
- [8] HUA Y N, SONG J L, MA Z L, et al. Effect of *RRS1* gene knockdown on BT549 cell line proliferation and apoptosis in breast cancer[J]. Neoplasma, 2019, 66(1):28-32.
- [9] SONG J L, MA Z L, HUA Y N, et al. Functional role of *RRS1* in breast cancer cell proliferation[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12):6304-6313.
- [10] WANG R Z, PENG C X, SONG J Y, et al. Downregulated *RRS1* inhibits invasion and metastasis of BT549 through RPL11-c-Myc-SNAIL axis[J]. Int J Oncol, 2022, 60(3):33.

- volving N-linked glycosylation: An update[J]. *Genet Med*, 2020,22(2):268-279.
- [3] ALTASSAN R, PÉANNE R, JAEKEN J, et al. International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up[J]. *J Inher Metab Dis*, 2019,42(1):5-28.
- [4] PENG T L, LV C, TAN H J, et al. Novel PMM2 missense mutation in a Chinese family with non-syndromic premature ovarian insufficiency[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020,37(2):443-450.
- [5] 王海军, 陆相朋, 卢婷婷, 等. 婴儿先天性糖基化异常 I a 型 1 例报告[J]. *临床儿科杂志*, 2017,35(3):195-198.
- [6] 张思思, 江伟, 王献虎, 等. 先天性糖基化障碍临床及遗传学分析[J]. *临床儿科杂志*, 2021,39(11):805-808.
- [7] 毋盛楠, 同霞, 陈琼, 等. PMM2 基因新变异致先天性糖基化异常一例[J/OL]. *中国临床案例成果数据库*, 2021,3(1):E280-E280.
- [8] 陈璇, 陈金龙, 程学英, 等. 先天性糖基化障碍 1a 型并扩张型心肌病 1 例[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2021,36(18):1426-1428.
- [9] 赵亚梅, 董伟, 张继要, 等. 先天性糖基化异常 2 家系 PMM2 基因突变分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019,34(21):1662-1664.
- [10] 张媛, 陈光福, 刘文兰. PMM2[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2020,12(4):357-361.
- [11] ZHANG Z, HUANG T L, MA J, et al. Clinical and whole-exome sequencing findings in two siblings from Hani ethnic minority with congenital glycosylation disorders[J]. *BMC Med Genet*, 2019,20(1):181.
- [12] 查剑, 曹芳芳, 徐瑜欣, 等. 以偏瘫就诊的 PMM2 相关性先天性糖基化障碍 1 例报告并文献复习[J]. *实用临床医学*, 2021,22(2):30-33.
- [13] SCHIFF M, RODA C, MONIN M L, et al. Clinical, laboratory and molecular findings and long-term follow-up data in 96 French patients with PMM2-CDG (phosphomannomutase 2-congenital disorder of glycosylation) and review of the literature[J]. *J Med Genet*, 2017,54(12):843-851.
- [14] TADAY R, GRÜNEBERG M, DUCHESNE I, et al. Dietary mannose supplementation in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG)[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2020,15(1):258.
- [15] IYER S, SAM F S, DIPRIMIO N, et al. Repurposing the aldose reductase inhibitor and diabetic neuropathy drug epalrestat for the congenital disorder of glycosylation PMM2-CDG[J]. *Dis Model Mech*, 2019,12(11):dmm040584.
- (本文编辑 范睿心 厉建强)
-
- (上接第 319 页)
- [11] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2016,66(2):115-132.
- [12] XUE Z, DONG X P, GUAN Y Z, et al. Research progress on epidemiological trend and risk factors of female breast cancer[J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2021,48:87-92.
- [13] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2015,65(1):5-29.
- [14] LI W, ZHENG X J, REN L W, et al. Epigenetic hypomethylation and upregulation of GD3s in triple negative breast cancer[J]. *Ann Transl Med*, 2019,7(23):723.
- [15] GAMBE A E, MATSUNAGA S, TAKATA H, et al. A nucleolar protein RRS1 contributes to chromosome congression[J]. *FEBS Letters*, 2009,583(12):1951-1956.
- [16] HORIGOME C, OKADA T, SHIMAZU K, et al. Ribosome biogenesis factors bind a nuclear envelope SUN domain protein to cluster yeast telomeres[J]. *EMBO J*, 2011,30(18):3799-3811.
- [17] CARNEMOLLA A, FOSSALE E, AGOSTONI E, et al. Rrs1 is involved in endoplasmic reticulum stress response in Huntington disease[J]. *J Biol Chem*, 2009,284(27):18167-18173.
- [18] GÓMEZ-HERREROS F, RODRÍGUEZ-GALÁN O, MORILLO-HUESCA M, et al. Balanced production of ribosome components is required for proper G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Biol Chem*, 2013,288(44):31689-31700.
- [19] YAN X J, WU S, LIU Q, et al. RRS1 promotes retinoblastoma cell proliferation and invasion via activating the AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020,2020:2420437.
- [20] ALZHRANI A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019,59:125-132.
- [21] WANG J, REN D P, SUN Y, et al. Inhibition of PLK4 might enhance the anti-tumour effect of bortezomib on glioblastoma via PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020,24(7):3931-3947.
- [22] HADDADI N, LIN Y G, TRAVIS G, et al. PTEN/PTE-NP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy[J]. *Mol Cancer*, 2018,17(1):37.
- [23] LIU Y, WANG D D, LEI M X, et al. GABARAP suppresses EMT and breast cancer progression via the AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(4):5858-5874.
- [24] REN F, WU K X, YANG Y, et al. Dandelion polysaccharide exerts anti-angiogenesis effect on hepatocellular carcinoma by regulating VEGF/HIF-1 α expression[J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:460.
- [25] JO M J, KIM B G, KIM W Y, et al. Cannabidiol suppresses angiogenesis and stemness of breast cancer cells by downregulation of hypoxia-inducible factors-1 α [J]. *Cancers*, 2021,13(22):5667.
- (本文编辑 耿波 厉建强)