

# SETD7 对三阴性乳腺癌阿霉素化疗耐药的作用机制

高丽丽<sup>1</sup>, 高丝<sup>2</sup>, 陈洋<sup>3</sup>, 孔宪明<sup>1,2</sup>

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127;  
3. 中国科学院大连物理化学研究所, 大连 116023)

**摘要:** 探讨 SETD7 甲基转移酶在介导三阴性乳腺癌 (TNBC) 阿霉素化疗耐受中的作用机制。首先, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建 SETD7 敲除的 TNBC 细胞系; 然后, 通过细胞功能实验 (CCK8 实验) 检测药物敏感性, 借助克隆形成实验检测细胞增殖情况, 运用流式细胞仪检测细胞凋亡; 最后, 通过蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 实验检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达变化。结果表明, SETD7 敲除对 TNBC 增殖活性无明显影响, 然而, SETD7 敲除或使用 SETD7 选择性抑制剂 (R)-PFI-2 增加了 TNBC 对遗传毒性药物阿霉素的敏感性。在阿霉素处理组中, SETD7 敲除的 TNBC 细胞增殖活性明显降低, 凋亡程度更高, 且凋亡相关蛋白 Bax 表达增加, 而 Bcl-2 表达降低。综上, SETD7 通过调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达, 增强了 TNBC 阿霉素化疗敏感性。

**关键词:** SETD7; 三阴性乳腺癌; 阿霉素; 化疗耐药

中图分类号: R 730.53 文献标志码: A

## Mechanisms of SETD7 in the doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer

GAO Lili<sup>1</sup>, GAO Si<sup>2</sup>, CHEN Yang<sup>3</sup>, KONG Xianming<sup>1,2</sup>

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;  
2. Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China;  
3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The role of SETD7 (su( var) 3-9, enhancer of zeste, trithorax-domain-containing protein 7)

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32060209)

第一作者: 高丽丽 (1983-), 女, 主管技师。研究方向: 乳腺癌转移及耐药机制。E-mail: 278304371@qq.com

通信作者: 孔宪明 (1963-), 男, 教授。研究方向: 肿瘤的发病机制、肿瘤类器官芯片系统等。E-mail: kxm666@aliyun.com

引文格式: 高丽丽, 高丝, 陈洋, 等. SETD7 对三阴性乳腺癌阿霉素化疗耐药的作用机制[J]. 上海理工大学学报, 2025, 47(1): 61-67.

Citation: GAO Lili, GAO Si, CHEN Yang, et al. Mechanisms of SETD7 in the doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer[J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2025, 47(1): 61-67.

methyltransferase in mediating doxorubicin chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer (TNBC) was explored. First, TNBC cell lines with SETD7 knockout were constructed using CRISPR-Cas9 gene editing technology. Then, drug sensitivity was assessed through CCK8 assays, cell proliferation was examined via colony formation assays, and apoptosis was measured using flow cytometry. Finally, the levels of apoptosis regulator Bcl-2 and Bax were detected by Western blotting analysis. The results show that SETD7 knockout had no significant impact on TNBC proliferation activity, but SETD7 knockout or the selective inhibitor of SETD7 (R)-PFI-2 increased TNBC sensitivity to the chemotherapeutic drug doxorubicin. In the doxorubicin-treated group, SETD7 knockout significantly reduced TNBC cell proliferation, increased apoptosis levels, and upregulated the apoptosis-relating protein Bax while downregulating Bcl-2 expression. In conclusion, SETD7 enhances TNBC doxorubicin chemotherapy sensitivity by regulating the expression of Bax and Bcl-2 proteins.

**Keywords:** SETD7; triple-negative breast cancer; doxorubicin; chemotherapy resistance

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是一种以缺乏雌激素、孕激素受体, 以及人表皮生长因子受体 2 表达和/或基因扩增缺失为特征的乳腺癌亚型。它占有浸润性乳腺癌的 15%~20%, 与其他乳腺癌亚型相比, 预后较差<sup>[1]</sup>。因缺乏靶向药物, 化疗是 TNBC 全身治疗的主要方法<sup>[2]</sup>。大约 30% 接受术前新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) 的 TNBC 女性可以达到病理完全缓解 (pathological complete response, pCR)。在临床试验中, 手术时实现 pCR 与良好的预后相关<sup>[3-4]</sup>。然而, 化疗耐药导致大多数患者的高复发率和不良预后。因此, 亟需确定新的分子靶点来克服 TNBC 化疗耐药。

甲基化作为表观遗传学中一种重要的修饰行为, 对靶蛋白的生物学功能有重要影响<sup>[5]</sup>。SETD7 (su( var) 3-9, enhancer of zeste, trithorax-domain-containing protein 7) 是蛋白质赖氨酸甲基转移酶 (protein lysine methyltransferases, PLMTs) 家族的一员, 不仅使组蛋白甲基化, 也能使非组蛋白底物甲基化<sup>[6-9]</sup>。SETD7 的失调在多种肿瘤中均有发现, 然而, 其在癌变中的作用和功能却存在较大差异<sup>[10]</sup>。一方面, 它可作为肿瘤抑制因子对结肠癌和非小细胞肺癌起到抑制作用<sup>[11-12]</sup>; 另一方面, SETD7 的上调也与包括卵巢癌和胶质瘤在内的几种恶性肿瘤的侵袭性行为相关<sup>[13-14]</sup>。

前期研究发现, 与癌旁组织相比, TNBC 组织中 SETD7 的表达水平更高。SETD7 的缺失阻止了

TNBC 细胞的迁移。此外, 还发现 SETD7 激活 ERK/MAPK 通路诱导 TNBC 细胞的上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 并以 YY1 依赖的方式促进这些细胞的迁移<sup>[15]</sup>。但是 SETD7 在 TNBC 阿霉素耐药中的作用机制尚未知晓, 因此, 本研究通过 SETD7 基因敲除或者添加选择性抑制剂 (R)-PFI-2, 探讨 SETD7 对 TNBC 细胞增殖、凋亡以及阿霉素化疗敏感性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

本研究采用 3 种三阴性乳腺癌细胞系。Hs578T、MDA-MB-231 和 MFM223 细胞系由中国科学院细胞库提供。采用高糖 DMEM 培养基, 添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素 (penicillin and streptomycin, P/S) 培养 Hs578T 和 MDA-MB-231 细胞系。MFM223 细胞系采用 RPMI 1640 培养基, 混合体积分数 10% 的 FBS 和 P/S。细胞培养于 37  $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳的培养箱中。

### 1.2 细胞增殖实验

将 TNBC 细胞以  $2 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 标准环境下常规培养。分别在第 1、2、3、4、5 d, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液, 孵育 2 h。酶标仪测定 450 nm 的吸光度。

采用集落形成法检测细胞克隆生成能力。接种 TNBC 细胞 (500 个/孔) 至 6 孔板, 细胞培养箱

培养 12 d, 然后对细胞进行甲醛固定和结晶紫染色, 人工计数可见菌落。

### 1.3 耐药实验

将 TNBC 细胞接种于 96 孔板, 以不同浓度的阿霉素处理 48 h, 并采用 CCK8 法测定细胞活力。绘制剂量反应曲线, 利用 GraphPad Prism 软件测定阿霉素的半最大抑制浓度 (the half-maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 值, IC<sub>50</sub> 值用于评估 TNBC 细胞对阿霉素的耐药性。

### 1.4 细胞凋亡检测

不同处理组的 TNBC 细胞使用 Annexin V-FITC/DRAQ7 细胞凋亡检测试剂盒进行流式细胞分析, 测定细胞凋亡率。用 FlowJo v10 软件分析, 绘制散点图, 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 为横坐标, 远红外 DNA 染料

(deep red anthraquinone 7, DRAQ7) 为纵坐标。

### 1.5 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 实验

用 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白裂解物, 与 100 μmol/L 苯基甲基磺酰氟和体积分数 1% 的磷酸酶抑制剂混合。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒测定细胞提取物浓度, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离等体积样品, 然后将样品转移到聚偏二氟乙烯膜上, 100 V, 转膜 100 min。将膜浸入无血清印迹阻断缓冲液中 15 min, 然后用一抗标记, 4℃ 孵育过夜。3 次洗涤后, 用山羊抗小鼠/抗兔第二抗体室温孵育 1 h, 检测膜的化学发光信号, 以内参蛋白 GAPDH 作为样品加载的内对照。一抗的详细信息如表 1 所示。

表 1 抗体信息

Tab.1 Related information of antibodies

抗体	公司名称	货号	稀释比
SETD7	Cell Signaling Technology	2825	1 : 1000
Bax	Proteintech	60267-1-Ig	1 : 20000
Bcl-2	Proteintech	68103-1-Ig	1 : 10000
GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig	1 : 200000

### 1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析, 计算数据的均值和标准差 (SD)。各实验组间的统计学差异采用 *t* 检验, 所有数据以 (均数±标准差) 表示, *p* < 0.05 表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SETD7 在 TNBC 细胞中的表达

本研究采用 Western blotting 法检测 3 种 TNBC 细胞系 (MDA-MB-231、Hs578T、MFM223) 中 SETD7 的表达水平。MDA-MB-231 细胞中 SETD7 表达较高, 而 Hs578T 细胞中蛋白的表达较低 (图 1(a))。采用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统分别在 MDA-MB-231 和 Hs578T 中建立 SETD7 过表达和敲除 (knock-out, KO) 细胞系, 并分别将其与对照组 (Ctrl) 相比较 (图 1(b)), 方法参见前期研究<sup>[15]</sup>。通过 CCK8 和集落形成实验来确定 SETD7

对细胞增殖的影响。SETD7 过表达或敲除对 TNBC 细胞生长 (图 1(c)、(d)) 和集落形成能力均无显著影响 (图 1(e)~(h))。

### 2.2 SETD7 在 MDA-MB-231 细胞阿霉素敏感性中的作用

为了评估 SETD7 基因敲除对 MDA-MB-231 细胞药物敏感性的影响。首先, 采用 CCK8 法检测 MDA-MB-231 对照组和 SETD7-KO 组细胞对阿霉素 (doxorubicin, Dox) 敏感性的差异。与对照组细胞相比, SETD7-KO 细胞对阿霉素治疗更敏感 (图 2(a))。通过对 SETD7 敲除细胞系和对照组细胞经阿霉素处理后的集落形成能力进行分析发现, MDA-MB-231 SETD7-KO 细胞在经阿霉素处理后开始死亡, 而对照组细胞仍能存活 (图 2(b)、(c))。与此一致的是, 通过 Annexin V 染色细胞的流式细胞法分析发现, 与对照组细胞相比, 阿霉素处理后 SETD7-KO 组细胞的凋亡水平增加 (图 2(d)~(f))。

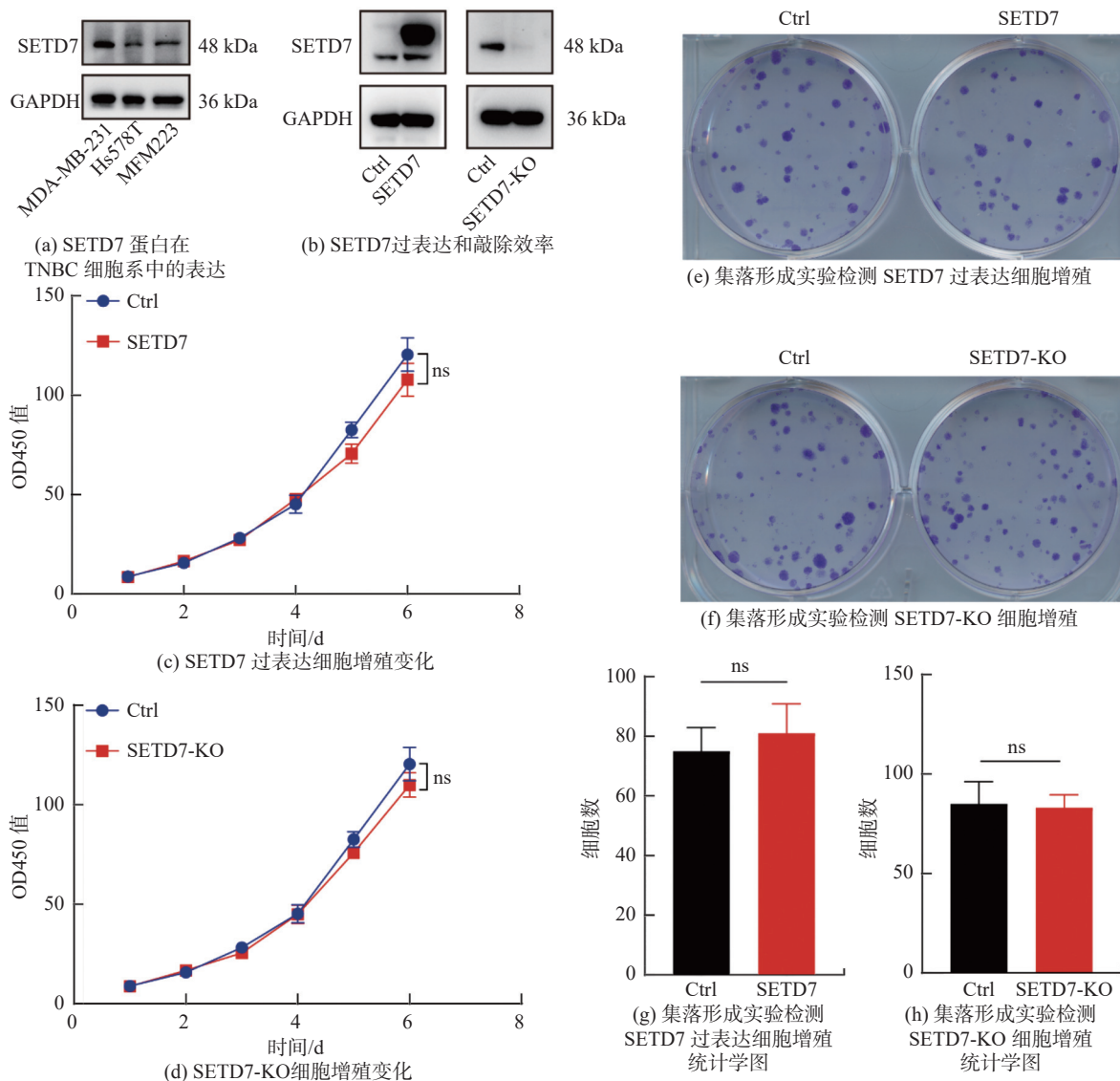


图 1 SETD7 在 TNBC 中的表达  
Fig.1 Expression of SETD7 in TNBC

### 2.3 SETD7 甲基转移酶活性选择性抑制剂 (R)-PFI-2 使 MDA-MB-231 细胞对阿霉素敏感

通过以上研究发现, MDA-MB-231 细胞的基因毒性耐药作用依赖于 SETD7, 推测 SETD7 的选择性抑制剂 (R)-PFI-2 同样可以增加 TNBC 细胞对阿霉素的敏感性。

不同浓度的 (R)-PFI-2 对细胞没有毒性作用, 也不影响细胞对阿霉素的敏感性, 因此, (R)-PFI-2 本身不会引起遗传毒性作用<sup>[11]</sup>。然而, 在 MDA-MB-231 细胞中敲除 SETD7 后, (R)-PFI-2 使细胞对阿霉素更敏感(图 3(a))。集落形成实验发现, (R)-PFI-2 增加了 MDA-MB-231 对阿霉素的敏感性

(图 3(b)、(c)), 流式细胞法分析结果得出了同样的结论(图 3(d)~(f))。

### 2.4 SETD7 对 MDA-MB-231 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平的调控作用

为了研究 SETD7 在三阴性乳腺癌阿霉素化疗耐药作用中的机制, 采用 Western blotting 实验检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平。结果显示: SETD7-KO 阿霉素处理组较其他 3 组 Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低(图 3(g)); (R)-PFI-2 加阿霉素组同样提高了 MDA-MB-231 细胞中 Bax 蛋白的表达水平, 降低了 Bcl-2 蛋白的表达(图 3(h))。



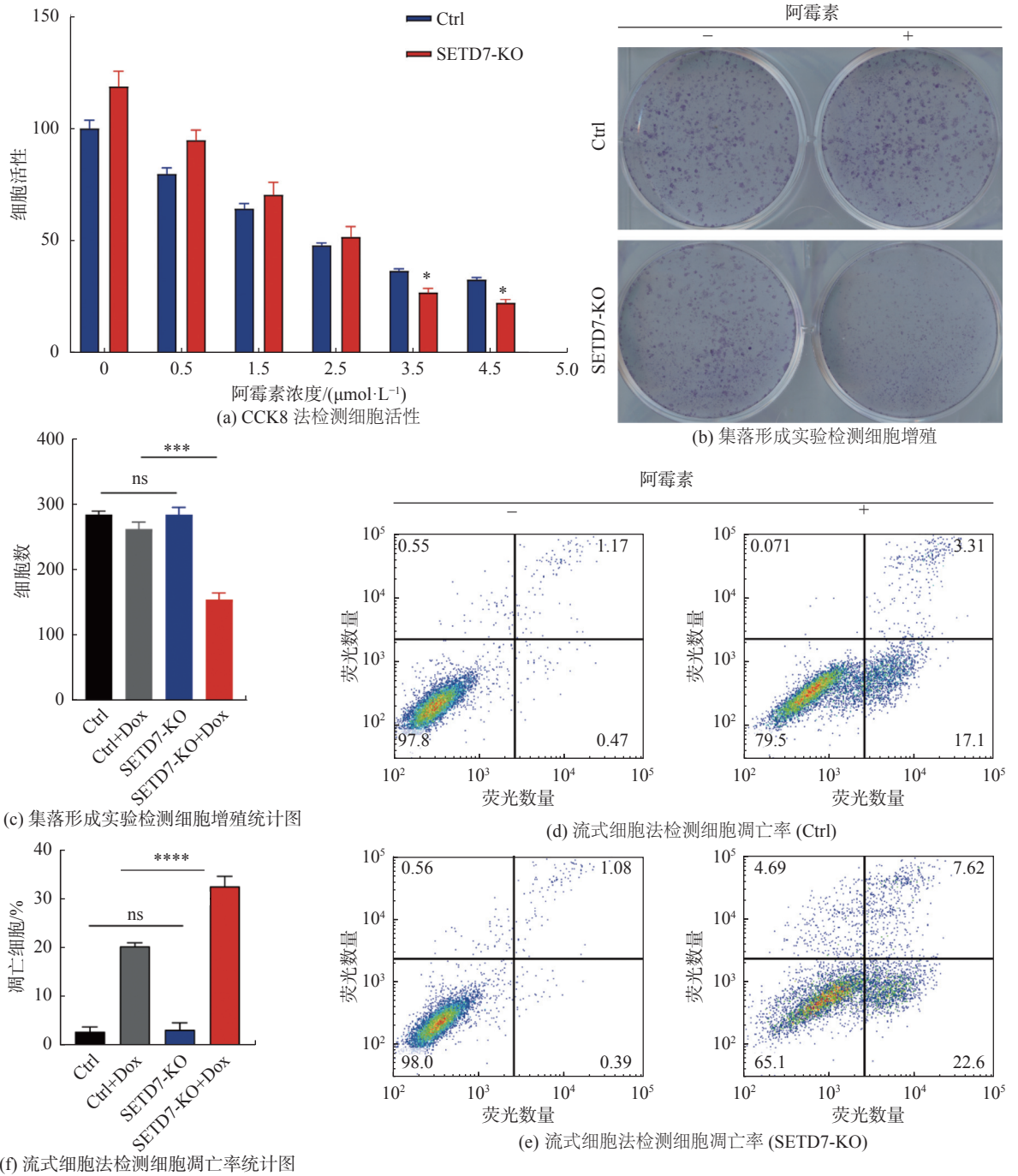


图 2 SETD7 对 MDA-MB-231 细胞阿霉素敏感性的影响

Fig.2 Effect of SETD7 on doxorubicin sensitivity in MDA-MB-231 cells

### 3 结果与讨论

由于 TNBC 化疗耐药性和预后不良, 治疗该疾病仍然是一个重大挑战。最近发现, SETD7 在 TNBC 临床样本中高表达<sup>[15]</sup>。同时也证明了这种蛋白赖氨酸甲基化转移酶促进三阴性乳腺癌细胞的迁移潜能<sup>[15]</sup>。然而, SETD7 在三阴性乳腺癌阿霉素化疗耐药中的作用此前尚未有研究涉及。本文研究

结果表明, SETD7 与 TNBC 临床常用化疗药物的耐药性密切相关, 同时, 证实了 SETD7 缺失能够增强阿霉素在体外诱导 TNBC 细胞系凋亡的作用。

Bcl-2 家族成员对细胞凋亡的调控作用显著<sup>[16-17]</sup>。Bcl-2 家族成员有抗凋亡和促凋亡两种作用。其中, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 被认为是决定细胞是否发生凋亡过程的关键<sup>[18]</sup>。本研究发现, 阿霉素处理后的 MDA-MB-231 SETD7-KO

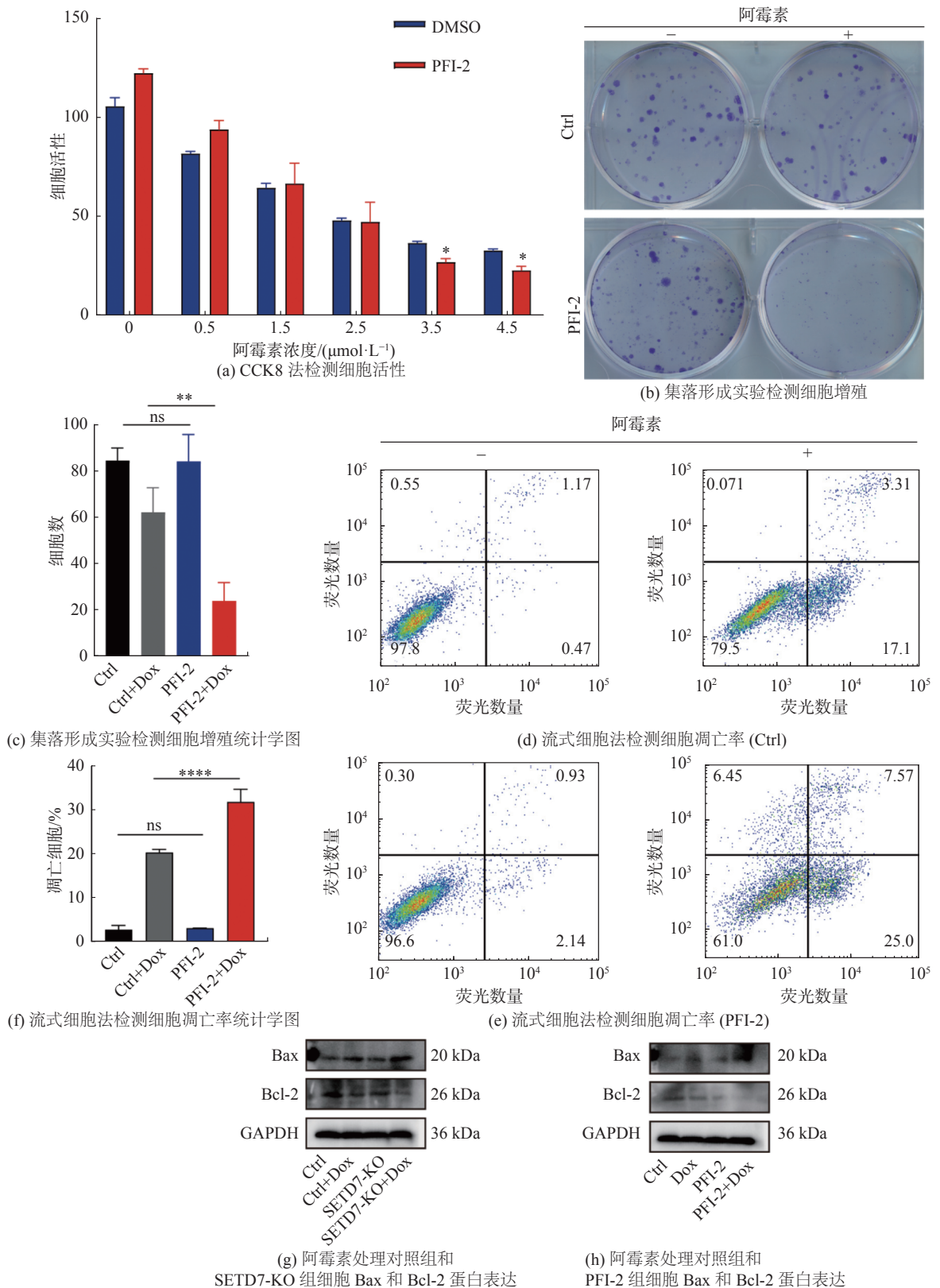


图3 SETD7对MDA-MB-231细胞Bax和Bcl-2蛋白表达水平的影响

Fig.3 Effect of SETD7 on the protein expression of Bax and Bcl-2 in MDA-MB-231 cells

细胞在蛋白水平上显著上调Bax、下调Bcl-2。Bcl-2家族蛋白可能在调控SETD7增加三阴性乳腺癌

阿霉素化疗敏感性中起重要作用。SETD7-KO细胞中细胞周期蛋白水平升高可能促进未修复双链

断裂的出现, 并提高对阿霉素的敏感性。综上所述, 这些结果提示 SETD7 参与了细胞周期蛋白的调控, 但其调控机制有待进一步研究。

许多前期研究都证实了 SETD7 参与了肿瘤的形成和进展<sup>[15, 19-20]</sup>, 本文为使用 SETD7 选择性抑制剂作为抗癌治疗的新策略提供了进一步的证据。

#### 参考文献:

- [1] ZOU Y T, XIE J D, ZHENG S Q, et al. Leveraging diverse cell-death patterns to predict the prognosis and drug sensitivity of triple-negative breast cancer patients after surgery[J]. *International Journal of Surgery*, 2022, 107: 106936.
- [2] LU B Y, NATARAJAN E, BALAJI RAGHAVENDRAN H R, et al. Molecular classification, treatment, and genetic biomarkers in triple-negative breast cancer: a review[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2023, 22: 1-10.
- [3] BISWAS T, EFIRD J T, PRASAD S, et al. The survival benefit of neoadjuvant chemotherapy and pCR among patients with advanced stage triple negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(68): 112712-112719.
- [4] HARADA T L, UEMATSU T, NAKASHIMA K, et al. Is the presence of edema and necrosis on T2WI pretreatment breast MRI the key to predict pCR of triple negative breast cancer?[J]. *European Radiology*, 2020, 30(6): 3363-3370.
- [5] LING C, RÖNN T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 29(5): 1028-1044.
- [6] GU R C, KIM T D, SONG H, et al. SET7/9-mediated methylation affects oncogenic functions of histone demethylase JMJD2A[J]. *JCI Insight*, 2023, 8(20): e164990.
- [7] MAHESH A, KHAN M I K, GOVINDARAJU G, et al. SET7/9 interacts and methylates the ribosomal protein, eL42 and regulates protein synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2020, 1867(2): 118611.
- [8] VASILEVA E, SHUVALOV O, PETUKHOV A, et al. KMT Set7/9 is a new regulator of Sam68 STAR-protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 525(4): 1018-1024.
- [9] YU R Y, WU H H, ISMAIL H, et al. Methylation of PLK1 by SET7/9 ensures accurate kinetochore-microtubule dynamics[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2020, 12(6): 462-476.
- [10] BINDA O. On your histone mark, SET, methylate![J]. *Epigenetics*, 2013, 8(5): 457-463.
- [11] DAKS A, MAMONTOVA V, FEDOROVA O, et al. Set7/9 controls proliferation and genotoxic drug resistance of NSCLC cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 572: 41-48.
- [12] ZHANG S L, DU X, TAN L N, et al. SET7 interacts with HDAC6 and suppresses the development of colon cancer through inactivation of HDAC6[J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(2): 602-611.
- [13] LI C, FENG S Y, CHEN L. SET7/9 promotes H3K4me3 at lncRNA DRAIC promoter to modulate growth and metastasis of glioma[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(23): 12241-12250.
- [14] ZHOU J, XIE M, SHI Y, et al. MicroRNA-153 functions as a tumor suppressor by targeting SET7 and ZEB2 in ovarian cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2015, 34(1): 111-120.
- [15] GAO L L, ZHANG J Z, LONG Q Q, et al. SETD7 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by YY1 lysine methylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2023, 1869(7): 166780.
- [16] TANG J Y, HE A H, JIA G, et al. Protective effect of selenoprotein X against oxidative stress-induced cell apoptosis in human hepatocyte (LO2) cells via the p38 pathway[J]. *Biological Trace Element Research*, 2018, 181(1): 44-53.
- [17] FRANKLIN J L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 14(8): 1437-1448.
- [18] HUANG Y K, CHANG K C, LI C Y, et al. AKR1B1 represses glioma cell proliferation through p38 MAPK-mediated Bcl-2/BAX/caspase-3 apoptotic signaling pathways[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(4): 3391-3405.
- [19] CHEN Y Y, YANG S S, HU J W, et al. Increased expression of SETD7 promotes cell proliferation by regulating cell cycle and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154939.
- [20] DUAN B J, BAI J, QIU J, et al. Histone-lysine N-methyltransferase SETD7 is a potential serum biomarker for colorectal cancer patients[J]. *eBioMedicine*, 2018, 37: 134-143.