

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.007

P65 基因对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外侵袭的影响

王玲,单保恩,桑梅香,连易水,丁春艳,周欣亮(河北医科大学第四医院肿瘤研究所免疫室,河北石家庄 050011)

[摘要] 目的:观察 miRNA 靶向沉默 P65 基因对人三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)MDA-MB-231 细胞体外黏附和侵袭的影响及其可能机制。方法:设计 3 对针对 P65 基因的特异性 miRNA(P65miRNA-1、P65miRNA-2 和 P65miRNA-3),转染 MDA-MB-231 细胞,Western blotting 检测 P65 蛋白的表达,筛选沉默效果最好的 miRNA 进行后续实验。体外黏附实验和 Transwell 小室实验检测 P65miRNA 转染前后 MDA-MB-231 细胞的黏附和侵袭。RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 mRNA 的表达水平,明胶酶谱法检测 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 的酶活性。结果:成功构建重组质粒 P65miRNA-1、P65miRNA-2 和 P65miRNA-3,前两者转染 MDA-MB-231 细胞后抑制 P65 蛋白表达 80% 以上。P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 转染对 MDA-MB-231 细胞的黏附无明显影响($P > 0.05$),但显著抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭(0.371 ± 0.039 、 0.309 ± 0.046 vs 0.698 ± 0.065 , $P < 0.05$)。P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 转染沉默 P65 表达后,MDA-MB-231 细胞 MMP-2 mRNA(0.281 ± 0.018 、 0.478 ± 0.023 vs 1.056 ± 0.072 、 1.128 ± 0.059 , $P < 0.05$)和 MMP-9 mRNA 表达(0.193 ± 0.013 、 0.371 ± 0.035 vs 1.206 ± 0.069 、 1.089 ± 0.057 , $P < 0.05$)及其活性均显著下调。结论:miRNA 靶向沉默 P65 的表达能抑制人 TNBC MDA-MB-231 细胞的体外侵袭,其机制可能与抑制 MMP-2、MMP-9 的表达和活性有关。

[关键词] 三阴性乳腺癌;miRNA;侵袭;P65 基因;MMP-2;MMP-9**[中图分类号]** R737.9; R730.54**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-385X(2011)05-0502-06**Effect of P65 gene on invasion of human triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231**

WANG Ling, SHAN Bao-en, SANG Mei-xiang, LIAN Yi-shui, DING Chun-yan, ZHOU Xin-liang (Department of Immunology, Tumor Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of targeting silence of P65 gene by miRNA on adhesion and invasion of human triple-negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-231 *in vitro* and its possible mechanism. **Methods:** Three pairs of miRNAs specifically targeting P65 gene (P65miRNA-1, P65miRNA-2 and P65miRNA-3) were designed and transfected into MDA-MB-231 cells, the level of P65 protein was detected by Western blotting, and P65miRNA with best silencing result was selected and used in the following experiments. The adhesive and invasive abilities of MDA-MB-231 cells before and after transfection were measured by adhesion assay and Transwell assay, respectively. mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 were detected by RT-PCR and the activities of MMP-2 and MMP-9 were examined by gelatin zymography assay. **Results:** P65miRNA-1, P65miRNA-2 and P65miRNA-3 plasmids were successfully constructed, P65miRNA-1 and P65miRNA-2, but not P65miRNA-3, transfection strongly inhibited the expression of P65 protein in MDA-MB-231 cells ($> 80\%$). The adhesion of MDA-MB-231 cells was not significantly influenced by P65miRNA-1 and P65miRNA-2 transfection ($P > 0.05$), while the invasive ability of MDA-MB-231 cells was significantly reduced after P65miRNA-1 or P65miRNA-2 transfection (0.371 ± 0.039 , 0.309 ± 0.046 vs 0.698 ± 0.065 , $P < 0.05$). Besides, mRNA expression of MMP-2 (0.281 ± 0.018 , 0.478 ± 0.023 vs 1.056 ± 0.072 , 1.128 ± 0.059 , $P < 0.05$) and MMP-9 (0.193 ± 0.013 , 0.371 ± 0.035 vs 1.206 ± 0.069 , 1.089 ± 0.057 , $P < 0.05$) and activities of

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目资助(No. 10276167)。Project supported by the Science and Technology Development Foundation of Hebei Province (No. 10276167)**[作者简介]** 王玲(1981-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤免疫学的研究。E-mail:wangling1981@yahoo.com.cn**[通信作者]** 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail:shanbaoen@yahoo.cn**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1618.004.html>

MMP-2 and MMP-9 in MDA-MB-231 cells after P65miRNA-1 or P65miRNA-2 transfection were significantly decreased.

Conclusion: Targeting silence of P65 expression can inhibit *in vitro* invasion of TNBC MDA-MB-231 cells, which is related to the down-regulation of MMP-2 and MMP-9 expression and their activities.

[**Key words**] triple-negative breast cancer; miRNA; invasion; P65 gene; MMP-2; MMP-9

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 502-507]

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)侵袭早、转移快,是乳腺癌中病死率最高的一个亚型^[1-2]。研究^[3]显示,TNBC的早期淋巴结转移发生率可高达50%以上,且TNBC发展进程迅速,常发生内脏及软组织如脊髓、脑、肝和肺等转移^[4,6]。Dent等^[3]发现,TNBC脑转移患者的中位生存时间为22个月,明显短于非三阴性乳腺癌患者的51个月。最近,美国哈佛大学Lin等^[7]进行的一项关于转移性乳腺癌预后研究发现,发生远处转移的TNBC患者中46%存在中枢神经系统的转移,患者转移后的中位生存期仅有4.9个月。目前,有研究^[8-9]显示,NF- κ B P65在TNBC中异常高表达,并可能与TNBC的侵袭和转移有关。为此,本研究选择了具有TNBC特性的乳腺癌细胞系MDA-MB-231为细胞模型,观察靶向沉默P65基因后对MDA-MB-231细胞体外侵袭能力的影响,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人TNBC细胞株MDA-MB-231购自中国科学院细胞库上海保藏中心,用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 μ g/ml)的DMEM完全培养基,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度条件下进行培养。倒置显微镜下观察细胞生长状态,细胞生长呈70%~80%融合状态时,以0.25%胰蛋白酶消化传代,隔日换液,每3~4 d传代1次。收集对数生长期细胞进行实验。

胎牛血清购自杭州四季青公司,高糖型DMEM培养基购自Gibco公司,胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)购自Sigma公司,TRIzol试剂、脂质体LipofectamineTM 2000、Opti-MEM[®] I无血清培养基购自美国Invitrogen公司,Matrigel胶购自美国BD Bioscience公司,Transwell侵袭小室购自美国Costar公司,兔抗人P65、GAPDH多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。M-MLV反转录试剂盒购自Fermentas公司,蛋白抽提及定量试剂盒购自美国Pierce公司,ECL化学发光试剂盒购自北京中杉生物有限公司。引物及探针由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 P65 miRNA 质粒表达载体的设计、合成

根据人P65基因序列[NM_021975]转录RNA的作用位置,设计3对长度为21 nt的核苷酸序列,经BLAST进行同源性比较分析,所设计的靶miRNA与人类细胞内其他基因没有同源性。在连接酶作用下与线性表达质粒pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR合成环形的重组质粒,构建了3个针对靶位点的质粒表达载体,即pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-P65-1(简称为P65miRNA-1)、pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-P65-2(简称为P65miRNA-2)、pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-P65-3(简称为P65miRNA-3)和阴性对照载体pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR-Negative(简称为Neg-miRNA)。

1.3 真核表达质粒 P65miRNA 转染 MDA-MB-231 细胞

转染前将MDA-MB-231细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于24孔板,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养24 h,然后吸尽上清液,用Opti-MEM[®] I无血清培养基将24孔板中的细胞漂洗2次。加入1 ml转染混合液(含2 μ g待转质粒和1 μ l LipofectamineTM 2000),培养12 h后,用含有10%胎牛血清的DMEM培养液洗细胞3遍,加1 ml完全DMEM培养液(含10%小牛血清、双抗生素)继续培养。

1.4 Western blotting 检测转染 P65miRNA 后 MDA-MB-231 细胞 P65 蛋白的表达

收集转染前后MDA-MB-231细胞,PBS缓冲液洗涤细胞3次,每次 $1\ 000 \times g$ 、5 min,弃上清,加入全细胞裂解液200 μ l,放置冰上1 h。4 $^{\circ}$ C、 $12\ 000 \times g$ 离心15 min,把上清移入新的EP管中,即为细胞总蛋白,-80 $^{\circ}$ C保存备用。按照试剂盒的操作步骤进行蛋白定量。取30 μ g蛋白进行10%SDS-PAGE,依目的蛋白分子量的Marker蛋白分离条带切下电泳后含目的蛋白的胶。电转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭,于室温封闭2 h。将封闭后的PVDF膜置入TTBS适当稀释的一抗(P65或GAPDH)溶液中,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动过夜。室温洗膜,将PVDF膜置入以TTBS 1:10 000稀释的适量辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗鼠、羊抗兔)溶液中,于室温反应2 h。ECL化学发光后,在暗室内将X线片置于保鲜膜

上,曝光。冲洗 X 线片,拍照扫描。采用成像分析软件对显色区带的信号强度进行相对定量分析,扫描灰度值用积分光密度值表示。

1.5 细胞基质黏附实验检测转染 P65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响

实验时取出预冷好的 Matrigel 胶,用无血清 DMEM 培养基将其稀释成 0.04 mg/ml,96 孔培养板中每孔 2 μg,37 °C 无菌风干过夜。每孔加入适量的无血清 DMEM 培养基,放置 30 min,洗去多余的胶。收集转染 72 h 的 P65miRNA-1、P65miRNA-2、Neg-miRNA 以及未转染(Mock)组细胞,以 5×10^4 /孔细胞接种在铺胶的 96 孔板中,每组设 6 个复孔的平行对照。置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 2 h,然后每孔加入 MTT 20 μl(5 mg/ml)继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 150 μl,在振荡器上震荡 10 min,然后在酶标仪 490 nm 波长处读取光密度值(D_{490})。以上实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室实验检测转染 P65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

实验采用带有 8 μm 微孔聚碳酸酯膜的 Transwell 小室,将 Matrigel(50 mg/L)胶和无血清 DMEM 培养基以 1:3 比例进行稀释。在小室上室铺 100 μl 稀释好的 Matrigel 胶,37 °C 无菌保持过夜,确保 Matrigel 胶充分聚合。收集转染 72 h 的 P65miRNA-1、P65miRNA-2、Neg-miRNA 以及 Mock 组细胞,用 DMEM 培养基调整细胞密度为 2×10^5 /ml,每孔加入 200 μl 细胞悬液于上室,用 DMEM 培养基补充至 1 ml。下室加入预先培养 MDA-MB-231 细胞 24 h 后的上清,每孔 600 μl。实验分组同前。共孵育约 24 h 后,取出上室。采用 MTT 法检测下室细胞的光密度值(D_{490})来表示肿瘤细胞的侵袭能力。以上实验重复 3 次。

1.7 RT-PCR 检测 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达

取各组 MDA-MB-231 细胞,提取细胞的总 RNA,进行 RNA 完整性及纯度的鉴定。使用反转录试剂盒,合成 cDNA。以 β-actin 为内参照,β-actin 的产物长度为 838 bp,扩增 β-actin 引物序列:上游引物为 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3',下游引物为 5'-CGTCATCCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'。扩增 MMP-2 引物序列:上游引物为 5'-GGATGATGCCTTTGCTCG-3',下游引物为 5'-CACTGGACATGGCGGTCT-3',预期 PCR 产物大小为 590 bp。扩增 MMP-9 引物序列:上游引物为 5'-AACTCACGCCAGTAGAAG-3',下游引物为 5'-GAGGTGACCGGATGTTCC-3',预期 PCR 产物大小

为 105 bp。

β-actin 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 50 s,60 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 40 s,32 个循环。72 °C 5 min,4 °C 终止。MMP-2 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 60 s,52 °C 退火 50 s;72 °C 延伸 90 s,30 个循环;72 °C 5 min,4 °C 终止。MMP-9 反应条件:94 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环。72 °C 5 min,4 °C 终止。取 5 μl PCR 扩增产物,直接加样于 1.5% 琼脂糖凝胶加样孔中,80 V 电压,电泳 30 min,用凝胶成像系统分析并拍摄图像,采用 Gel-Pro Analyzer 3.1 分析软件分析条带灰度值。mRNA 表达相对值 = 目的片段灰度值/β-actin 灰度值。实验重复 3 次。

1.8 明胶酶谱法检测 MMP-2、MMP-9 的活性

收集转染 72 h 后 P65miRNA-1、P65miRNA-2、Neg-miRNA 及未转染组 MDA-MB-231 细胞的培养上清液,15 μl 上样于含 0.1% 明胶的 10% SDS-PAGE 进行电泳。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液中振荡洗脱 2 次,每次 45 min,然后用漂洗液洗脱 2 次,每次 30 min。随后将凝胶置于孵育液中 37 °C 孵育 40 h,孵育结束后,经考马斯亮蓝染色并脱色,显示出 MMP-2、MMP-9 为位于蓝色背景上的透明条带,图像分析系统在灰阶模式下扫描并分析活性条带灰度值。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计学处理,实验组与对照组比较用 *t* 检验,两组以上数据比较用方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P65miRNA 质粒抑制 MDA-MB-231 细胞 P65 的表达

重组质粒 P65miRNA-1、P65miRNA-2、P65miRNA-3 及 Neg-miRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 24、48、72 h 后,转染 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 组可以使 MDA-MB-231 细胞 P65 蛋白表达下调,而转染 P65miRNA-3 对 P65 蛋白沉默效果较差,Neg-miRNA 和未转染组细胞对 P65 蛋白的表达无影响。故 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 两个质粒进行后续实验。转染 72 h 时,转染 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 质粒对细胞 P65 蛋白水平的抑制率可达 80% 以上(图 1)。

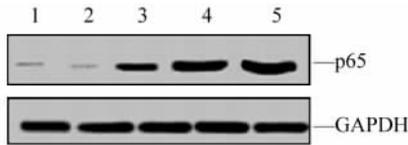


图1 Western blotting 检测转染 P65miRNA 后 MDA-MB-231 细胞 P65 蛋白的表达

Fig. 1 P65 protein expression in MDA-MB-231 cells after P65miRNA transfection as analyzed by Western blotting

1,2,3: p65miRNA; 4: Neg-miRNA; 5: Mock

2.2 P65miRNA 质粒对 MDA-MB-231 细胞黏附、侵袭的影响

细胞基质黏附实验结果发现,在 Matrigel 包被的 96 孔细胞培养板中,细胞种植后 2 h,转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2 组与阴性对照 Neg-miRNA 及 Mock 细胞比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

Transwell 侵袭小室实验结果显示,转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2 组细胞与阴性对照 Neg-miRNA 及 Mock 细胞比较,穿过基底膜的细胞数值显著下降 ($P < 0.05$,表 1)。Mock 组细胞与 Neg-miRNA 细胞比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。P65miRNA 质粒转染抑制 P65 的表达使 MDA-MB-231 细胞穿过 Matrigel 的数目减少,提示 P65 基因可促进 MDA-MB-231 细胞的侵袭。

表 1 P65miRNA 质粒对 MDA-MB-231 细胞的黏附和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, D_{490}$)

Tab. 1 Effects of P65miRNA plasmids on adhesion and invasion of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, D_{490}$)

Group	Adhesion	Invasion
Mock	0.316 ± 0.029	0.698 ± 0.065
Neg-miRNA	0.401 ± 0.032	0.603 ± 0.075
P65miRNA-1	0.473 ± 0.019	0.371 ± 0.039*
P65miRNA-2	0.381 ± 0.043	0.309 ± 0.046*

* $P < 0.05$ vs Neg-miRNA group or Mock group

2.3 P65miRNA 质粒抑制 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 2)显示,转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2 组 MDA-MB-231 细胞的 MMP-2 mRNA 灰度值分别为 0.193 ± 0.013 、 0.371 ± 0.035 ,低于未转染 Mock 组 (1.206 ± 0.069) 和 Neg-miRNA 组 (1.089 ± 0.057) ($P < 0.05$)。而 Mock 组和 Neg-miRNA 组 MDA-MB-231 细胞 MMP-2 mRNA 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此,P65miRNA 质粒转染可抑制 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达。

组的 1.128 ± 0.059 ($P < 0.05$)。而 Mock 组和 Neg-miRNA 组 MDA-MB-231 细胞 MMP-2 mRNA 数值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

RT-PCR 结果显示,转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2 组 MDA-MB-231 细胞的 MMP-9 mRNA 灰度值分别为 0.193 ± 0.013 、 0.371 ± 0.035 ,低于未转染 Mock 组 (1.206 ± 0.069) 和 Neg-miRNA 组 (1.089 ± 0.057) ($P < 0.05$)。而 Mock 组和 Neg-miRNA 组 MDA-MB-231 细胞 MMP-2 mRNA 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此,P65miRNA 质粒转染可抑制 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达。

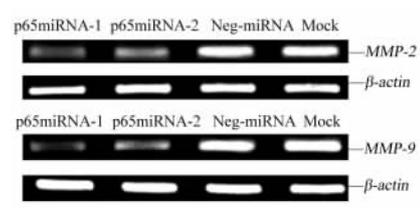


图2 转染 P65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of P65miRNA transfection on expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA

2.4 P65miRNA 质粒抑制 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的活性

明胶酶谱分析结果(图 3)显示,转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2、Neg-miRNA 组 MDA-MB-231 细胞的 MMP-2 蛋白活性分别是 Mock 组的 (12.6 ± 2.3)%、(8.7 ± 1.5)%、(89.7 ± 11.6)%。转染 P65miRNA-1、P65miRNA-2、Neg-miRNA 组 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 活性分别是 Mock 组的 (5.3 ± 1.8)%、(4.6 ± 0.9)%、(115.3 ± 21.1)%。提示转染 p65miRNA 抑制了 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性。

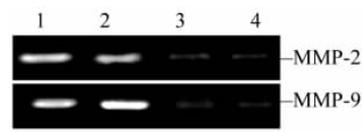


图3 转染 P65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞 MMP-2、MMP-9 活性的影响

Fig. 3 Effects of P65miRNA transfection on activities of MMP-2 and MMP-9

1: Mock; 2: Neg-miRNA; 3: p65miRNA-1; 4: p65miRNA-2

3 讨论

侵袭和转移是 TNBC 患者治疗失败和死亡的直接原因, 抑制转移成为提高 TNBC 治疗效果的关键。NF- κ B 是乳腺癌转移相关基因中重要的一种核转录因子, 通常情况下 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B 结合, 呈非活性状态处于胞质中。当受到各种胞外刺激时便可释放亚基 P65, P65 转位进入细胞核, 与相应的靶基因序列结合, 调控下游多种靶基因进行表达^[10-11]。P65 是 NF- κ B 复合体中负责由胞外向核内传递信息的快反应因子, 是 NF- κ B 信号通路中的枢纽因子, 也是多种信号转导途径的汇聚点, 可以启动多种生命活动进程^[12-13]。有研究^[14-15]显示, 侵袭性高的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 NF- κ B 的 DNA 结合能力比无侵袭性乳腺癌 MCF-7 细胞高得多。在 MDA-MB-231 细胞中加入 NF- κ B 的特异性抑制剂能够抑制细胞的迁移。这些结果提示, NF- κ B 调控着 MDA-MB-231 细胞的运动特性。本课题前期研究(结果未发表)表明, P65 在 TNBC 组织中表达高于正常乳腺组织和乳腺良性肿瘤组织, 且与肿瘤的恶性程度及转移、预后有关。因此, 本实验利用 RNA 干扰技术抑制 TNBC 细胞中 P65 基因的表达, 探讨 P65 基因阻断对 TNBC 恶性肿瘤侵袭和转移的影响。

miRNA 是一类长约 20 ~ 25 个核苷酸的非编码的单链 RNA 分子。它通过与靶 mRNA 完全或不完全的互补配对, 促进目标 mRNA 降解或抑制蛋白翻译。本研究采用的 pcDNATM6. 2-GW/EmGFP-miR 质粒载体是将含有 miR-155 侧翼序列的前体结构插入 siRNA 表达载体, 从而构建成 miRNA 真核表达载体。该表达载体含有 pol II 启动子, 可高水平构成性表达 miRNA, 并且可在大多数哺乳动物细胞株中表达^[16-17]。重组质粒 P65miRNA 转染入 MDA-MB-231 细胞后, 经 Western blotting 检测, P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 转染可显著抑制 MDA-MB-231 细胞中 P65 蛋白的表达。

细胞与细胞外基质的黏附是细胞迁移的重要因素, 本研究检测了转染 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 前后 MDA-MB-231 细胞体外黏附能力的变化。结果发现, 干扰 P65 基因后, MDA-MB-231 细胞的黏附性无明显改变。因此, 本研究进一步采用 Matrigel 胶重建基底膜的 Transwell 小室实验, 研究 P65 基因对 MDA-MB-231 细胞侵袭行为的影响, 发现 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 转染组 MDA-MB-231 细胞与对照组细胞比较, 穿过基底膜的细胞数值显

著减少, 提示 P65miRNA 转染抑制 P65 基因表达后, MDA-MB-231 细胞分解 Matrigel 胶的能力减弱, 细胞穿过 Transwell 小室下表面的数目减少, 抑制了 MDA-MB-231 细胞的体外侵袭能力。

MMPs 是一种锌离子依赖性蛋白内切酶, 肿瘤的侵袭多是因为 MMPs 与其天然特异性抑制剂 TIMP 调节失控的结果。在目前的 MMPs 家族中, MMP-2 和 MMP-9 被认为与乳腺癌的侵袭、转移以及骨破坏有关^[18-20]。本室前期研究^[21]发现, 塞来昔布可以不同程度地降低 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达, 从转录水平抑制肿瘤细胞 MMP 的表达, 防止过量的 MMPs 聚集在细胞周围, 阻断肿瘤细胞转移。但 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 的活性调节是否受 P65 基因的调控呢? 为了探讨这一点, 本研究观察了转染 P65miRNA-1 和 P65miRNA-2 前后 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 及其活性的变化, 结果发现, 沉默 P65 基因后 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 水平和酶活性下降。这些结果提示干扰 P65 的表达后细胞的 MMP-2、MMP-9 mRNA 转录水平降低, 进而使 MMP-2、MMP-9 活性降低。但由于体内生理环境的复杂性, 体外的实验结果并不能代替体内的病理过程, 为此有必要开展相关体内的实验研究, 为临床治疗提供必要的实验依据, 进一步的研究正在进行中。

综上所述, 靶向干扰 P65 基因的表达能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭, 为逆转 TNBC 肿瘤的侵袭力提供了可靠的实验依据, 有望成为治疗 TNBC 的一种新策略。

[参考文献]

- [1] Rastelli F, Biancanelli S, Falzetta A, et al. Triple-negative breast cancer: Current state of the art [J]. Tumori, 2010, 96(6): 875-888.
- [2] De Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 183-192.
- [3] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- [4] Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer [J]. Cancer, 2007, 109(1): 25-32.
- [5] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [6] Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show

- preferential site of relapse [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(9): 3108-3114.
- [7] Lin NU, Claus E, Sohl J, et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: High incidence of central nervous system metastases [J]. *Cancer*, 2008, 113(10): 2638-2645.
- [8] Caldas-Lopes E, Cerchietti L, Ahn JH, et al. Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(20): 8368-8373.
- [9] 罗湘, 史艳侠, 李志铭, 等. 核因子- κ B 在三阴性乳腺癌中的表达及其意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(5): 513-516.
- [10] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: To be or not to NF- κ B [J]. *Circ Res*, 2011, 108(9): 1122-1132.
- [11] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology [J]. *Cell Res*, 2011, 21(2): 223-244.
- [12] O'Shea JM, Perkins ND. Regulation of the RelA (p65) transactivation domain [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 4): 603-608.
- [13] Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(10-12): 775-787.
- [14] Bachmeier BE, Mohrenz IV, Mirisola V, et al. Curcumin down-regulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NF- κ B [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4): 779-789.
- [15] Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, et al. Osteopontin: It's role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression [J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(6): 441-447.
- [16] Wang QZ, Xu W, Habib N, et al. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(4): 572-594.
- [17] Rao DD, Senzer N, Cleary MA, et al. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: What is slowing clinical development [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(11): 807-809.
- [18] Jezierska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: A mini-review [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(2): RA32-40.
- [19] Yuan Z, Sanders AJ, Ye L, et al. Knockdown of human antigen R reduces the growth and invasion of breast cancer cells *in vitro* and affects expression of cyclin D1 and MMP-9 [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(1): 237-45.
- [20] Daniele A, Zito AF, Giannelli G, et al. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3521-3527.
- [21] 王玲, 单保恩, 张建彬. 塞来昔布对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移、侵袭及黏附性的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(4): 266-271.
- [收稿日期] 2011 - 07 - 28 [修回日期] 2011 - 09 - 09
[本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

化疗后死亡肿瘤细胞的 caspase-3 活化是肿瘤细胞再生的开始

化疗和放射治疗通过诱发凋亡直接杀灭肿瘤细胞,达到治疗肿瘤的目的,这是在肿瘤治疗中公认的一个重要机制。但是,最近一项研究显示,死亡的肿瘤细胞能够利用细胞凋亡过程中活化的 caspase-3 蛋白刺激肿瘤细胞的再增殖。这一研究成果 2011 年 7 月份公布在 *Nature Medicine* 上。

尽管“加速再增殖(accelerated repopulation)”这一最初由英国放射生物学家观察到的现象已经被反复描述了 40 余年,但是其机制至今未被澄清。Huang 等从肿瘤细胞培养、动物肿瘤模型、患者临床病理切片中循序渐进地验证了死亡细胞 caspase-3 与肿瘤细胞再生之间的关系。化疗后死亡细胞释放的 caspase-3 通过切割与其结合的蛋白后活化,刺激肿瘤细胞再增殖。而且不仅死亡的肿瘤细胞释放的活化 caspase-3 能促进肿瘤细胞再增殖,经化疗后死亡的肿瘤基质细胞释放的活化 caspase-3 也具有相同功能。研究发现,caspase-3 首先活化了不依赖钙的磷脂酶(Ca^{2+} -independent phospholipase A2, iPLA),活化的 iPLA 可刺激花生四烯酸(arachidonic acid, AA)产生。AA 是 PGE_2 的前体,通过 PGE_2 促进肿瘤细胞增殖。最终作者通过临床研究证实,与传统观点相反,在肿瘤患者中,治疗(化疗或放疗)前肿瘤组织中高水平 caspase-3 预示患者预后不良。

死亡细胞激活肿瘤细胞增殖的调控网络、以及 caspase-3 在肿瘤再增殖中的作用机制还未弄清楚,但是,caspases-3 激活后可刺激肿瘤细胞再增殖现象的发现,预示着使用 caspase-3 抑制剂增强化疗效果这一“反传统”想法的可行性及临床价值,以及活化的 caspase-3 可作为肿瘤患者预后的预测因子。死亡细胞刺激残存肿瘤细胞加速再增殖的现象以及 caspases-3 激活信号通路的发现,开启了一扇崭新的研究肿瘤治疗失败和复发的窗口。

[方宏亮 摘译,万涛 审阅. Huang Q, Li F, Liu X, et al. *Nat Med*, 2011, 17(7): 860-866]