

【基础研究】

通信作者:王亚东(1975-),男,河南信阳人,博士,副主任技师,研究方向:卫生毒理学;E-mail:wangyd76@163.com。

MCF-7-EV group ($P < 0.05$). The expression level of β -catenin of cells in the MCF-7-TGIF group was significantly higher than that in the MCF-7-EV group ($P > 0.05$), and there was no difference in the expression levels of E-cadherin and N-cadherin between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Human breast cancer MCF-7 cells with overexpressing TGIF promote the migration and invasion ability *in vitro*, which may be related to Wnt/ β -catenin signaling pathway. TGIF may be involved in the migration and invasion of human breast cancer cells.

Key words: transforming growth-interacting factor; breast cancer; MCF-7 cells; cell proliferation; cell migration; cell invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率均位居女性恶性肿瘤之首。2018 年,全世界约有 208 万例新发女性乳腺癌患者,约 62 万例女性肿瘤患者因乳腺癌而死亡^[1]。转化生长影响因子(transforming growth-interacting factor, TGIF)是一种转录抑制因子,参与视黄酸信号通路、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路及 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路。既往研究表明, TGIF 与白血病、肺癌、尿路上皮细胞癌和胃肠道肿瘤等多种肿瘤的发生、发展及预后有关^[2-8]。研究发现, TGIF 表达异常与乳腺癌的发生有关, TGIF 过表达与三阴性乳腺癌患者不良结局明显相关,敲除 TGIF 基因可抑制小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)-Wnt-1 转基因小鼠乳腺癌的发生^[9]。沉默 TGIF 基因能够抑制三阴性乳腺癌细胞的体外侵袭和迁移能力,并抑制该细胞在裸鼠体内的肺转移^[10-11],说明 TGIF 与乳腺癌的侵袭和转移有关。为进一步了解 TGIF 在乳腺癌侵袭和迁移中的生物学作用,本研究选取侵袭潜能相对较低的雌激素受体阳性人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型,构建 TGIF 过表达细胞株,探讨 TGIF 过表达对人乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人乳腺癌 MCF-7 细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供,液氮冷冻保存。

1.2 主要试剂与仪器 达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶和遗传霉素(geneticin, G418)购自美国 Gibco 公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Anti-Flag-HRP 抗体购自美国 Sigma 公司, β -catenin 抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)抗体和神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和蛋

白定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司,电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL)显色试剂盒购自美国 BIO RAD 公司, Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, Matrigel 基质胶、细胞培养板购自美国 BD Biosciences 公司, Transwell 小室试剂盒购自美国 Novus Biologicals 公司, TGIF 真核表达质粒、空质粒(empty vector, EV)由本实验室克隆构建保存; CO₂ 培养箱购自美国 Revco 公司,电泳仪、半干转膜仪、Chemi Doc™ XRS + 化学发光成像系统购自美国 Bio-Rad 公司,酶标仪购自芬兰雷勃公司,倒置显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 细胞培养、分组及转染 (1)细胞培养:取复苏的 MCF-7 细胞,置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中,于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中饱和湿度培养,2~3 d 换 1 次培养基,细胞密度达 80%~90% 时,用胰蛋白酶消化,传代培养。(2) MCF-7 细胞分组及转染:取对数生长期 MCF-7 细胞,按每孔 5×10^5 个细胞接种于加有 DMEM 的 6 孔培养板中,分为 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组,第 2 天将 2 组细胞的培养基更换为无血清 DMEM;将 100 μ L 无血清 DMEM、7.5 μ L Lipofectamine 2000 加入 1.5 mL 离心管,混匀,室温放置 5 min,加入 5 μ L TGIF 质粒($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)混匀,室温放置 20 min 后,将混合液加入 MCF-7-TGIF 组细胞中;另取 100 μ L 无血清 DMEM、7.5 μ L Lipofectamine 2000 加入 1.5 mL 离心管,混匀,室温放置 5 min,加入 5 μ L 空质粒($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)混匀,室温放置 20 min 后将混合液加入 MCF-7-EV 组细胞中;2 组细胞转染 5 h 后更换无血清 DMEM,继续培养至转染 48 h,加入 G418 ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)进行阳性克隆筛选,每 3~4 d 更换含有 G418 的无血清 DMEM,得到阳性克隆后,传代细胞,加 G418 筛选培养至 21 d 获得稳定表达的细胞株。

1.4 Western blot 法检测 MCF-7 细胞中 Anti-Flag 蛋白表达 取转染后的 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组细胞,分别接种于 60 mm 培养皿中,当细胞生长

至 80% ~ 90% 融合时,收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)冲洗 3 次,每组加入 750 μ L 蛋白裂解液,于冰上裂解 15 min,移至 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}$ C 下 14 000 $\times g$ 离心 15 min,收集上清液,应用蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,计算并调整 2 组细胞间总蛋白浓度均等。取 30 μ L 蛋白样品上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、半干转膜仪转膜后,以脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 Anti-Flag-HRP 抗体(1 : 1 000)和 β -actin 抗体(1 : 1 000)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜后进行洗膜,加入 HRP 标记的二抗(1 : 5 000),室温孵育 1 h。ECL 显色液避光反应 1 min,用 Chemi DocTM XRS + 化学发光成像系统采集图像。因 TGIF 质粒带有 Flag 标签,所以根据 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组细胞蛋白提取液中 Anti-Flag 蛋白的表达量鉴定 TGIF 过表达的人乳腺癌细胞株是否构建成功。

1.5 四甲基偶氮唑盐比色 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测 2 组 MCF-7 细胞的增殖能力 分别取 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组转染后对数生长期的细胞接种于加有含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 的 96 孔板中进行培养,每孔 1 $\times 10^4$ 个细胞,每组设 6 个平行孔。于培养 20、44、68、92 h 后,加 10 μ L (5 g \cdot L⁻¹) MTT 到各孔中,继续孵育 4 h,弃培养基,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,室温低速摇动 10 min,用酶标仪测定波长 492 nm 处各孔的吸光度值,以吸光度值大小表示细胞增殖能力;取均值。

1.6 划痕实验检测 2 组 MCF-7 细胞的迁移能力 分别取 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组转染后对数生长期的细胞,按每孔 1 $\times 10^6$ 个细胞接种于 6 孔培养板,待细胞生长至完全融合时,用 200 μ L Tip 头沿孔中央直线划痕,用 PBS 洗去漂浮细胞,加入无血清的 DMEM,继续培养。于划痕后 48 h 用倒置显微镜拍摄照片,记录划痕愈合情况,计算各组细胞的相对迁移能力。细胞相对迁移能力 = (实验组初始划痕宽度 - 实验组观察时间点的划痕宽度) / (MCF-7-EV 组初始划痕宽度 - MCF-7-EV 组观察时间点的划痕宽度)。实验重复 3 次,取均值。

1.7 Transwell 小室实验检测 2 组 MCF-7 细胞的侵袭能力 分别取 MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组转染后对数生长期的细胞 3 $\times 10^5$ 个,接种于铺有基质胶的 Transwell 小室内,下层 24 孔培养板加入 600 μ L 含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM,水平放置于 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中,培养 24 h 后,用棉签擦去小室膜上层的细胞,小室膜下

层的细胞经甲醇/冰醋酸(3 : 1)固定,结晶紫染色,蒸馏水冲洗晾干,用倒置显微镜随机取视野拍照后,加 200 μ L 体积分数 33% 冰醋酸溶液脱色 10 min,用酶标仪测定波长 570 nm 处洗脱液的吸光度值,计算各组细胞的相对侵袭能力。细胞相对侵袭能力 = 实验组吸光度值 / MCF-7-EV 组吸光度值。实验重复 3 次,取均值。

1.8 Western blot 法检测 2 组细胞中 β -catenin、E-cadherin 和 N-cadherin 表达水平 取“1.4”项构建成功的蛋白样品 30 μ L 上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、半干转膜仪转膜后,用脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 β -catenin 抗体(1 : 500)、E-cadherin 抗体(1 : 500)、N-cadherin 抗体(1 : 500)和 β -actin 抗体(1 : 1 000)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜后进行洗膜,加入 HRP 标记的二抗(1 : 5 000),室温孵育 1 h。ECL 显色液避光反应 1 min,用 Chemi DocTM XRS + 化学发光成像系统采集图像,应用 Image J 图像分析软件检测各条带灰度值, β -catenin、E-cadherin 和 N-cadherin 相对表达量以目的蛋白灰度值与内参蛋白(β -actin)灰度值的比值表示。实验重复 3 次,取均值。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组 MCF-7 细胞中 Anti-Flag 蛋白表达 结果见图 1。MCF-7-TGIF 组细胞中检测到 Anti-Flag 蛋白表达,MCF-7-EV 组细胞中未检测到 Anti-Flag 蛋白表达,TGIF 过表达的人乳腺癌细胞株构建成功。

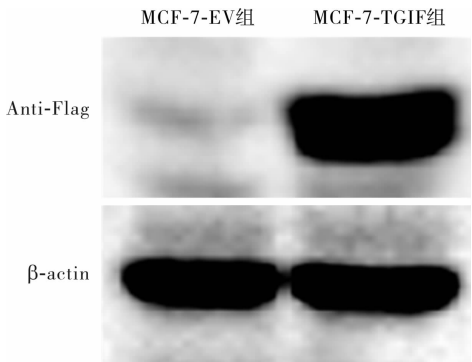


图 1 2 组 MCF-7 细胞中 Anti-Flag 蛋白表达 (Western blot)

Fig. 1 Expression of Anti-Flag protein in MCF-7 cells in the two groups (Western blot)

2.2 2 组 MCF-7 细胞增殖能力比较 结果见表 1。接种 24、48、72、96 h 后,MCF-7-TGIF 组细胞增殖能力与 MCF-7-EV 组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 2 组 MCF-7 细胞增殖能力比较

Tab.1 Comparison of proliferation ability of MCF-7 cells between the two groups (x±s)

组别	n	MCF-7 细胞增殖能力			
		培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h	培养 96 h
MCF-7-EV 组	6	0.286 ± 0.025	0.485 ± 0.031	0.821 ± 0.049	1.417 ± 0.068
MCF-7-TGIF 组	6	0.292 ± 0.023	0.534 ± 0.042	0.766 ± 0.054	1.478 ± 0.072

2.3 2 组 MCF-7 细胞迁移能力比较 结果见图 2。细胞划痕培养 48 h 后,MCF-7-EV 组和 MCF-7-TGIF 组细胞相对迁移能力分别为 1.00 ± 0.12 和 1.63 ± 0.09; MCF-7-TGIF 组细胞相对迁移能力高于 MCF-7-EV 组,差异有统计学意义(P < 0.05)。

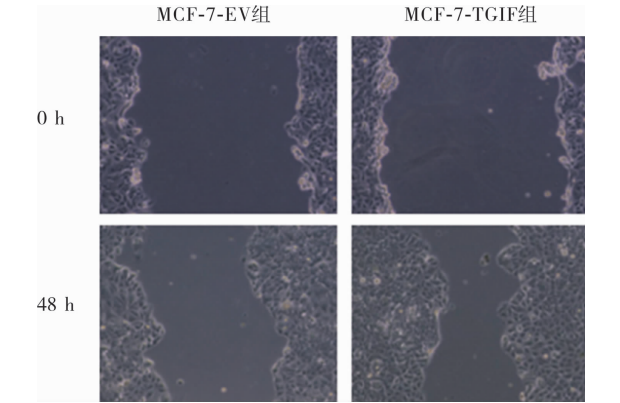


图 2 2 组 MCF-7 细胞迁移情况(划痕实验, ×100)
Fig.2 Migration of MCF-7 cells in the two groups(scratch test, ×100)

2.4 2 组 MCF 细胞侵袭能力比较 结果见图 3。MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组细胞相对侵袭能力分别为 1.00 ± 0.08 和 1.76 ± 0.14; MCF-7-TGIF 组细胞侵袭能力高于 MCF-7-EV 组,差异有统计学意义(P < 0.05)。

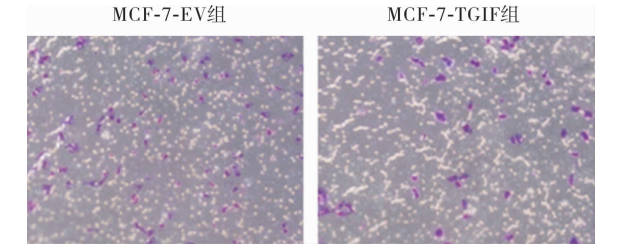


图 3 2 组 MCF-7 细胞侵袭情况(结晶紫染色, ×200)
Fig.3 Invasion of MCF-7 cells in the two groups (crystal violet staining, ×200)

2.5 2 组 MCF 细胞中 β -catenin、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达比较 结果见图 4。MCF-7-TGIF 组和 MCF-7-EV 组细胞中 E-cadherin 蛋白相对表达量分别为 0.93 ± 0.04、0.89 ± 0.09, N-cadherin 蛋白相对表达量分别为 0.99 ± 0.09、1.04 ± 0.11, β -catenin 蛋白相对表达量分别为 0.65 ± 0.06、0.52 ± 0.04。MCF-7-TGIF 组细胞中 β -catenin 蛋白相对表达量高于 MCF-7-EV 组,差异有统计学意义(P < 0.05);

2 组细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义(P > 0.05)。

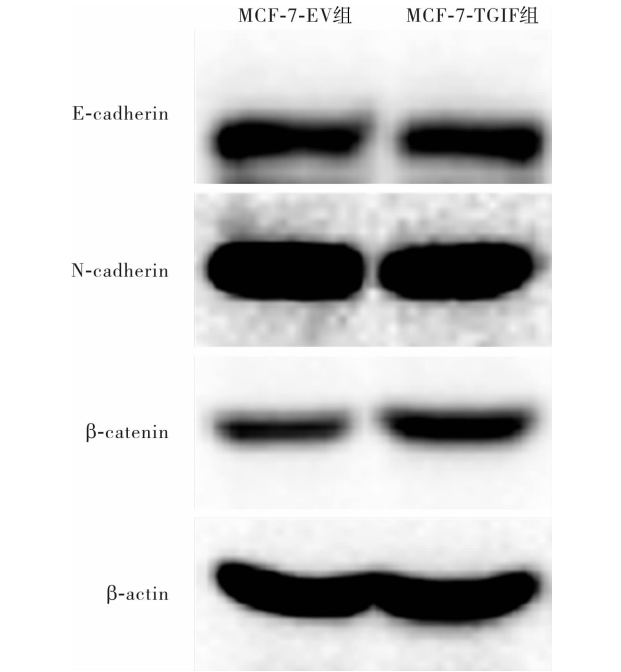


图 4 2 组 MCF-7 细胞中 β -catenin、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达 (Western blot)
Fig.4 Expression of β -catenin, E-cadherin and N-cadherin protein in MCF-7 cells in the two groups (Western blot)

3 讨论

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁患者的生命健康。2018 年,全球女性乳腺癌的发病率约为 24.2%,病死率约为 15.0%,乳腺癌是女性人群中发病率和病死率最高的癌症^[12]。乳腺癌引起死亡的主要原因是转移相关的并发症,因此,研究乳腺癌转移的发生、发展机制并建立抑制肿瘤转移的有效方法具有重要意义。

TGIF 是一种表达于多种细胞和组织中的核内转录抑制因子,其参与了包括 TGF- β 信号通路和 Wnt/ β -catenin 信号通路在内的多条细胞信号传导通路的调节。本课题组既往研究发现,用小干扰 RNA 沉默侵袭能力相对较高的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的 TGIF 基因后,该细胞的体外迁移和侵袭能力及其在裸鼠体内发生肺内转移的能力降低^[10],说明 TGIF 在乳腺癌转移中起一定的生物学作用。为进一步了解 TGIF 在乳腺癌的侵袭和迁移中的生物学

作用,本研究以侵袭能力相对较低的人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型,构建 TGIF 过表达细胞株,因 TGIF 质粒带有 Flag 标签,本研究采用 Western blot 法检测了 MCF-7 细胞中 Anti-Flag 的表达,结果显示, MCF-7-TGIF 组 MCF-7 细胞中检测到 Anti-Flag 蛋白表达,而 MCF-7-EV 组 MCF-7 细胞中未检测到 Anti-Flag 蛋白表达,说明 TGIF 过表达的人乳腺癌 MCF-7 细胞株构建成功;进一步分析发现, MCF-7-TGIF 组 MCF-7 细胞的体外相对侵袭能力和体外相对迁移能力高于 MCF-7-EV 组,说明过表达 TGIF 促进了人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外侵袭能力和体外迁移能力,证实了 TGIF 在乳腺癌转移中起重要作用。

β -catenin 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键分子,参与乳腺癌的侵袭转移过程^[13]。研究表明, β -catenin 的异常表达与原发性人乳腺癌的临床病理相关^[14],MMTV-Wnt-1 转基因小鼠乳腺癌表现为伴随 β -catenin 蛋白活性明显升高的促生长特征^[15]。沉默 TGIF 基因可抑制人乳腺癌细胞 β -catenin 蛋白的表达,有关 TGIF 调节 β -catenin 蛋白表达的分子机制研究表明,TGIF 与 β -catenin 降解复合物中的 Axin1 和 Axin2 相互作用,并使 Axin1 和 Axin2 从 β -catenin 降解复合物中解离,从而允许 β -catenin 蛋白在细胞内累积^[9]。本研究中, MCF-7-TGIF 组 MCF-7 细胞 β -catenin 蛋白表达水平高于 MCF-7-EV 组,表明过表达 TGIF 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路而促进人乳腺癌细胞侵袭及迁移。

E-cadherin 和 N-cadherin 是上皮细胞表型向间质细胞表型转化过程中的关键分子,在乳腺癌的侵袭转移中起一定作用。过表达 E-cadherin 可抑制人乳腺癌细胞侵袭转移能力,E-cadherin 表达水平降低与乳腺癌转移呈正相关;而 N-cadherin 表达水平升高与乳腺癌发生转移呈正相关^[16-17]。本研究中,2 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平比较差异无统计学意义,这一研究结果尚需进一步的实验加以证实。

综上所述,过表达 TGIF 在体外可促进人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭,其机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,TGIF 可能参与了乳腺癌细胞的迁移和侵袭过程,但其具体的调控机制尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018,68(6):394-424.

[2] HÄRDFELDT J, HODSON L, LARSSON L, et al. Effects on hepatic lipid metabolism in human hepatoma cells following overexpression of TGF β induced factor homeobox 1 or 2[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019,1864(5):756-762.

[3] YAN L, DAVÉU P, ENGEL M, et al. Loss of TG-interacting factor 1 decreases survival in mouse models of myeloid leukaemia[J]. *J Cell Mol Med*, 2020,24(22):13472-13480.

[4] WANG Y, SHI L, LI J, et al. The roles of TG-interacting factor in cadmium exposure-promoted invasion and migration of lung cancer cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2019,61:104630.

[5] YEH B W, WU W J, LI W M, et al. Overexpression of TG-interacting factor is associated with worse prognosis in upper urinary tract urothelial carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2012,181(3):1044-1055.

[6] SHAH A, MELHUIST T A, FOX T E, et al. TGIF transcription factors repress acetyl CoA metabolic gene expression and promote intestinal tumor growth[J]. *Genes Dev*, 2019,33(7/8):388-402.

[7] WANG Y D, PAN T, LI L, et al. Knockdown of TGIF attenuates the proliferation and tumorigenicity of EC109 cells and promotes cisplatin-induced apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2017,14(6):6519-6524.

[8] LI J, HU M, LIU N, et al. HDAC3 deteriorates colorectal cancer progression via microRNA-296-3p/TGIF1/TGF β axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020,39(1):248.

[9] ZHANG M Z, FERRIGNO O, WANG Z, et al. TGIF governs a feed-forward network that empowers Wnt signaling to drive mammary tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2015,27(4):547-560.

[10] WANG Y D, LI L, WANG H Y, et al. Silencing TGIF suppresses migration, invasion and metastasis of MDA MB 231 human breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018,39(2):802-808.

[11] KWON Y J, LEIBOVITCH B A, BANSAL N, et al. Targeted interference of SIN3A-TGIF1 function by SID decoy treatment inhibits Wnt signaling and invasion in triple negative breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017,8(51):88421-88436.

[12] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019,69(6):438-451.

[13] XU X, ZHANG M, XU F, et al. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2020,19(1):165.

[14] ZHANG X, LUO Y, LI Q. TMED3 promotes proliferation and migration in breast cancer cells by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Onco Targets Ther*, 2020,13:5819-5830.

[15] MARIC M, ANNIS M G, MACDONALD P A, et al. GPNMB augments Wnt-1 mediated breast tumor initiation and growth by enhancing PI3K/AKT/mTOR pathway signaling and β -catenin activity[J]. *Oncogene*, 2019,38(26):5294-5307.

[16] NA T Y, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020,117(11):5931-5937.

[17] MASUDA T, UEO H, KAI Y, et al. N-cadherin mRNA levels in peripheral blood could be a potential indicator of new metastases in breast cancer; a pilot study[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(2):511.