

文章编号 1006-8147(2015)06-0466-03

论 著

人附睾蛋白4在乳腺癌发生发展中的机制研究

周岩¹, 宋伟杰¹, 张飞¹, 冀为¹, 田然¹, 牛瑞芳¹, 黎小沛²

(1.天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 肿瘤研究所公共实验室, 天津 300060; 2.天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

摘要 目的:探讨人附睾蛋白4(HE4)在乳腺癌发生发展中的机制研究。方法:采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测15例原发乳腺癌组织及其配对的癌旁正常组织中HE4 mRNA的表达水平。RT-qPCR和Western blot检测常见乳腺(癌)细胞系中HE4 mRNA和蛋白表达水平。通过RNA干扰技术沉默HE4高表达的乳腺癌SKBR3细胞中HE4表达,通过CCK8和克隆形成实验分析沉默HE4表达对SKBR3细胞增殖的影响。流式细胞术检测沉默HE4表达对SKBR3细胞凋亡的影响。Western blot检测沉默HE4表达对Erk和Akt磷酸化水平的影响。结果:HE4 mRNA在乳腺癌组织中高表达;沉默HE4表达抑制乳腺癌细胞SKBR3细胞增殖能力并促进其凋亡,Erk和Akt蛋白磷酸化水平降低。结论:HE4通过影响Erk和Akt信号通路促进乳腺癌发生发展。

关键词 人附睾蛋白4;乳腺癌;增殖;凋亡

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Action mechanism of human epididymis protein 4 in development and progression of breast cancer

ZHOU Yan¹, SONG Wei-jie¹, ZHANG Fei¹, JI Wei¹, TIAN Ran¹, NIU Rui-fang¹, LI Xiao-pe²

(1.Department of Public Laboratory, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China; 2.Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of human epididymis protein 4 (HE4) in development and progression of breast cancer. **Methods:** Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the HE4 mRNA expression levels in primary breast cancer tissues and the paired adjacent normal tissues. The HE4 mRNA and protein expression was also detected in breast epithelial cell lines by RT-qPCR and western blot, respectively. The RNAi was used to knock down the HE4 expression in HE4 high expression level cell line SKBR3, CCK8 and colony formation assays were performed to analyze the proliferation ability. Flow cytometry was applied to detect the apoptotic cells in HE4-depleted cells. The phosphorylation expression levels of Erk and Akt was evaluated by western blot. **Results:** The HE4 mRNA was up-regulated in primary breast cancer tissues compared with the adjacent normal breast tissues. Depletion of HE4 expression suppressed the proliferation and promoted the apoptosis in SKBR3 breast cancer cell line. Furthermore, the phosphorylation expression levels of Erk and Akt were reduced in HE4-depleted SKBR3 cells. **Conclusion:** HE4 promotes breast cancer development and progression through Erk and Akt signaling.

Key words human epididymis protein 4; breast cancer; proliferation; apoptosis

乳腺癌是严重威胁妇女健康的恶性肿瘤,其发病率及死亡率在我国均呈上升趋势。乳腺癌的发生发展是一个多基因参与的复杂的演变过程,其病因及机制尚未完全阐明。因此,研究乳腺癌发生发展的分子机制是建立其早期诊断和治疗的重要途径,对提高患者生存具有重要意义。人附睾蛋白4(human epididymis protein 4, HE4),其编码基因位于20q12~13q.1,编码124个氨基酸的HE4蛋白前体。该蛋白含有由8个半胱氨酸和4个二硫键组成的,

高度保守的WAP(Whey Acidic Protein)结构域。目前关于HE4的研究集中在卵巢癌的早期筛查、诊断和预后评价,其在乳腺癌中的作用鲜有报道。本研究探讨HE4在乳腺癌组织中的表达情况及其与乳腺癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集天津医科大学肿瘤医院2005年2月~2006年8月原发乳腺癌组织及配对的癌旁正常组织各15例。均为术中立即取材,组织标本立即冻存于-80℃冰箱中。

1.1.2 试剂 Lipofectamine 2000, cDNA SuperScript II Reverse Transcriptase, Fast SYBR Green Master Mix

基金项目 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目基金资助(10JCYBJC14400)

作者简介 周岩(1985-),女,硕士在读,研究方向:生物医学工程;通信作者:黎小沛, E-mail: xpli@tjmu.edu.cn。

System、Trizol、RPMI-1640、DMEM/F12、胎牛血清、马血清等购于 Life Technologies 公司。HE4 抗体购于 Abcam 公司,Erk、AKT、p-Erk 和 p-AKT 抗体购于 Cell Signaling 公司, β -actin 抗体购于 Sigma 公司。CCK8 试剂盒购于 Takara 公司,HE4 siRNAs 购于上海吉凯公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺上皮细胞 MCF10A、乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 和 SKBR3 购于中国生命科学院上海细胞库。MCF10A 细胞培养于含有 5% 马血清、10 μ g/mL 胰岛素、0.5 μ g/mL 氢化可的松、20 ng/mL EGF 和 100 ng/mL 霍乱毒素的 DMEM/F12 培养基中,MCF7、MDA-MB-231 和 SKBR3 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 中。所有培养基含有 1% 青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL),于含 5%CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 转染前一天将 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板,无抗生素培养基培养,采用 Lipofectamine 2000 转染试剂,按说明书进行操作,转染后 6 h 换为新鲜培养基,进行后续实验。

1.2.3 RNA 的提取 采用 Trizol 试剂提取组织标本或细胞总 RNA,微量核酸定量分析仪测定浓度并进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.2.4 逆转录荧光定量 PCR 采用 cDNA SuperScript II Reverse Transcriptase 反转录试剂盒将 RNA 逆转录为单链 cDNA,荧光定量 PCR 采用 Fast SYBR Green Master Mix System 荧光定量 PCR 试剂盒,反应条件按照试剂盒说明书进行。 β -actin 作为管家基因。

1.2.5 Western blot 细胞转染后 48 h 加入适量裂解液,变性后取 50 μ g 总蛋白,经 10%SDS-PAGE 转印至 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入相应一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 PBS 洗膜后加入相应二抗,室温孵育 1 h,加入 ECL 曝光。

1.2.6 CCK8 实验 将转染后的细胞接种于 96 孔板,培养相应时间后,加入 10 μ L CCK8 溶液,继续培养 4 h,450 nm 处检测吸光度。

1.2.7 克隆形成 细胞转染 24 h 后制备成单细胞悬液,按每孔 1 000 个细胞接种于 6 cm 培养皿,每 3 d 换 1 次培养液,培养 3 周后,用 PBS 漂洗,4% 多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 15 min 后,在显微镜下计数,每 50 个细胞以上记为一个克隆。

1.2.8 流式细胞术 细胞转染后 48 h,收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 100 μ L 染料结合缓冲液重悬后,分别加入 10 μ L FITC-Annexin V 和 5 μ L PI (50 mg/L) 染料,室温孵育 15 min,补加 200 μ L 结合

缓冲液,静置 5 min 后经流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件,实验结果用均值 \pm 标准误表示,结果采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE4 在乳腺癌组织和癌旁正常组织的表达水平 采用 RT-qPCR 检测了 15 例原发性乳腺癌组织及配对的癌旁正常组织中 HE4 mRNA 的表达水平,结果显示较配对的癌旁正常组织,在 80% (12/15) 的样本中,原发性乳腺癌组织 HE4 mRNA 表达上调 ($P < 0.001$) (图 1)。

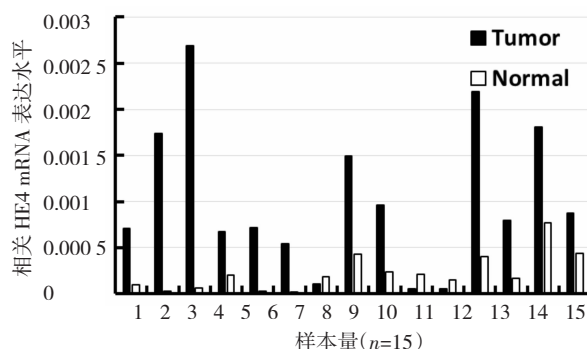
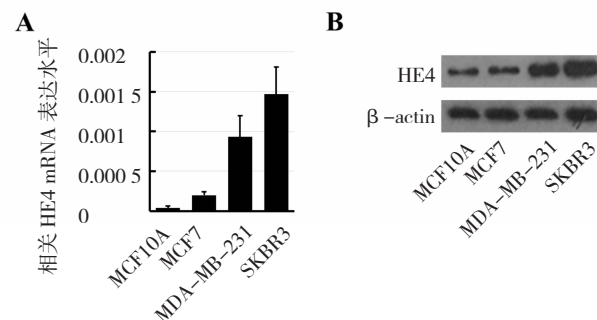


图 1 RT-qPCR 检测原发性乳腺癌组织及配对的癌旁正常组织中 HE4 mRNA 表达水平

Fig 1 Detecting the expression level of HE4 mRNA in primary breast cancer tissues and the paired adjacent normal tissue

2.2 HE4 在乳腺癌细胞系及乳腺上皮细胞系中表达水平 通过定量 PCR 检测正常乳腺细胞 MCF10A 和乳腺癌细胞系 MCF7、MDA-MB-231 和 SKBR3 中 HE4 mRNA 表达水平,结果显示 HE4 在正常细胞中低表达,在乳腺癌细胞系中呈高表达 (图 2A)。进一步通过 Western blot 检测 HE4 蛋白表达水平,结果显示 HE4 蛋白表达水平与 mRNA 结果一致,在 MCF10A 中低表达,MCF7、MDA-MB-231、SKBR3 中高表达 (图 2B)。证实 HE4 在乳腺癌中是潜在的促癌基因。

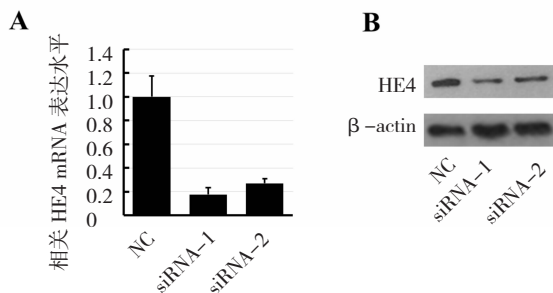


A. RT-qPCR 检测 HE4 RNA 在乳腺(癌)细胞系中表达水平;
B. Western blot 检测 HE4 蛋白在乳腺(癌)细胞系中表达水平

图 2 HE4 在乳腺(癌)细胞系中表达水平

Fig 2 The expression of HE4 in breast cancer cell line

2.3 siRNA 对 HE4 表达水平的影响 细胞转染 HE4 siRNAs 24 h 后提取细胞总 RNA, RT-qPCR 显示实验组 HE4 mRNA 表达水平较对照下降约 80% (图 3A)。细胞转染 48 h 后提取细胞总蛋白, Western blot 显示实验组 HE4 蛋白表达水平较对照组显著降低(图 3B)。提示 HE4 siRNAs 能有效抑制 SKBR3 细胞中 HE4 表达。

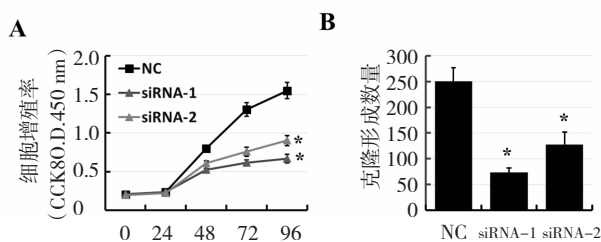


A. RT-qPCR 检测转染 HE4 siRNAs 后 SKBR3 细胞 HE4 mRNA 的表达水平; B. Western blot 检测转染 HE4 siRNAs 后 SKBR3 细胞 HE4 蛋白的表达水平

图 3 转染 HE4 siRNAs 后 SKBR3 细胞 HE4 的表达水平

Fig 3 The expression of HE4 in transfected SKBR3 cell with siRNAs

2.4 HE4 表达对乳腺癌细胞增殖的影响 结果显示, 沉默 HE4 后细胞增殖能力显著降低 (图 4A); 沉默 HE4 表达的 SKBR3 细胞克隆个数显著减少 (图 4B)。提示沉默 HE4 表达能抑制乳腺癌细胞系 SKBR3 的细胞增殖能力。



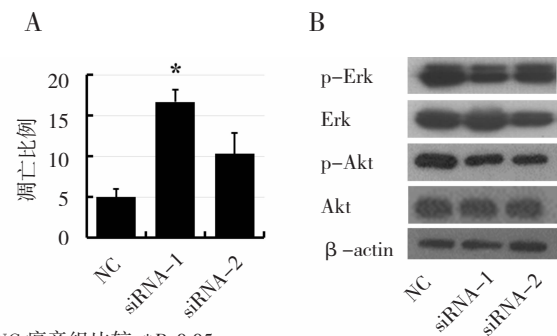
与 NC 癌旁组比较, * $P < 0.05$

A. CCK8 检测沉默 HE4 表达对 SKBR3 细胞增殖能力的影响; B. 克隆形成实验检测沉默 HE4 表达对 SKBR3 细胞克隆形成能力的影响

图 4 沉默 HE4 表达对乳腺癌细胞 SKBR3 增殖能力的影响

Fig 4 Effect of silencing HE4 on SKBR3 cell proliferation

2.5 HE4 表达对乳腺癌细胞凋亡及相关信号通路的影响 结果显示, 沉默 HE4 表达的 SKBR3 细胞凋亡比例显著上调 (10%~15% vs 5%; 图 5A)。沉默 HE4 表达后磷酸化的 Erk 和 Akt 表达下调 (图 5B), 提示沉默 HE4 表达可通过抑制 Erk 和 Akt 信号通路, 而导致乳腺癌细胞凋亡。



与 NC 癌旁组比较, * $P < 0.05$

A. 流式细胞术检测沉默 HE4 表达对乳腺癌细胞系 SKBR3 细胞凋亡的影响; B. Western blot 检测磷酸化及非磷酸化 Erk 和 Akt 表达水平

图 5 沉默 HE4 表达对细胞凋亡及相关信号通路的影响

Fig 5 Effect of silencing HE4 on cell apoptosis and signal pathway

3 讨论

人附睾蛋白 4 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 并存在多种剪切方式^[1]。目前关于 HE4 的生物学功能尚不清楚, 其编码的小分子分泌型蛋白与细胞外蛋白酶抑制剂具有高度同源性, 其是由乳清酸性蛋白 (WAP-type fourdisulphide core protein, WFDC) 基因编码的分泌型糖蛋白, 但其是否同家族中的蛋白酶抑制因子一样具有抑制蛋白水解酶作用, 还有待于进一步研究^[2]。

HE4 表达水平与多种肿瘤形成具有一定相关性, Galgano 等^[3]报道 HE4 在多种恶性肿瘤组织中高表达, 如子宫内膜癌、胃癌、支气管肺(腺)癌、卵巢癌和乳腺癌等, 且 HE4 表达水平与该肿瘤的发生发展存在相关性。通过 RNA 干扰技术沉默卵巢癌细胞中的 HE4 表达, 结果显示沉默 HE4 表达的卵巢癌细胞发生 G1 期阻滞, 且细胞增殖、运动和侵袭能力显著降低^[4]。同时, 外源表达 HE4 蛋白不仅能显著增强子宫内膜癌和卵巢癌的体外细胞增殖、侵袭能力, 还明显促进了动物移植瘤的生长和转移^[5-6]。近期研究也表明沉默 HE4 表达能抑制胃癌的进展, 且 HE4 表达水平与胃癌、小细胞肺癌患者预后相关^[7-8]。Hellstrom 等^[9]比较了卵巢癌患者及正常人血清中 HE4 蛋白的含量, 结果显示多数卵巢癌患者血清中 HE4 蛋白高表达, 但关于 HE4 在乳腺癌中的表达状态及生物学作用还鲜有报道, 本研究证实 HE4 在乳腺癌组织中高表达。进一步通过 RNA 干扰技术发现, 沉默 HE4 表达的乳腺癌细胞 SKBR3 体外增殖能力显著降低, 凋亡能力显著增强。因此, HE4 蛋白的异常表达可能在多种肿瘤的演变过程中发挥着重要的作用。

然而, HE4 参与肿瘤形成的具体信号通路目前 (下转第 483 页)

mL Puromycin,待该细胞全部杀死时,即认为转染组存活下来的细胞为带有 Puromycin 抗性的阳性细胞。之后撤掉药物,使用完全培养基对其进行培养和单克隆筛选。最后,使用 Western Blot 对单克隆细胞进行鉴定,从而获得 HeLa 细胞 *SND1* 基因敲除稳定株。

参考文献:

- [1] Saarikettu J, Ovod V, Vuoksio M, et al. Monoclonal antibodies against human Tudor-SN[J]. Hybridoma (Larchmt), 2010,29(3):231
- [2] Rodríguez L, Ochoa B, Martínez M J. NF- κ B and Sp1 are involved in transcriptional regulation of rat *SND1* p102 gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,356(1):226
- [3] Broadhurst M K, Lee R S, Hawkins S, et al. The p100 EBNA-2 coactivator: a highly conserved protein found in a range of exocrine and endocrine cells and tissues in cattle[J]. Biochim Biophys Acta, 2005,1681(2/3):126
- [4] Zhao C T, Shi K H, Su Y, et al. Two variants of zebrafish p100 are expressed during embryogenesis and regulated by Nodal signaling [J]. FEBS Lett, 2003,543(1/3):190
- [5] Liu X, Dong L, Zhang X, et al. Identification of p100 target promoters by chromatin immunoprecipitation-guided ligation and selection (ChIP-GLAS)[J]. Cell Mol Immunol, 2011,8(1):88
- [6] Gao X, Zhao X, Zhu Y, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN) participates in small ribonucleoprotein (snRNP) assembly via interacting with symmetrically dimethylated Sm proteins[J]. J Biol Chem, 2012,287(22):18130
- [7] Su C, Zhang C, Tecle A, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN), a novel regulator facilitating G1/S phase transition, acting as a co-activator of E2F-1 in cell cycle regulation[J]. J Biol Chem, 2015, 290(11):7208
- [8] Gao X, Fu X, Song J, et al. Poly (a)(+) mRNA-binding protein Tudor-SN regulates stress granules aggregation dynamics[J]. FEBS J, 2015, 282(5):874
- [9] Saarikettu J, Ovod V, Vuoksio M, et al. Monoclonal antibodies against human Tudor-SN[J]. Hybridoma (Larchmt), 2010,29(3):231
- [10] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013,8(11):2281
- [11] Yu L, Liu X, Cui K, et al. *SND1* Acts downstream of TGF β 1 and upstream of smurf1 to promote breast Cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2015,75(7):1275
- [12] Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-Mediated modular RNA-Guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. Cell, 2013,154(2):442
- [13] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6):1380

(2015-04-13 收稿)

(上接第 468 页)

仍不清楚,初步研究显示可能与其激活 NF- κ B 和 EGFR-MAPK 信号通路有关^[10-11]。本研究证实,沉默 HE4 表达后,磷酸化的 Erk 和 Akt 水平显著降低,而 Erk 和 Akt 在细胞增殖和凋亡中发挥着重要的作用^[12]。提示 HE4 可能通过调控 Erk 和 Akt 参与乳腺癌的增殖和凋亡,其内在的分子机制尚需进一步阐明。

综上,HE4 作为一种新的肿瘤标志物正在引起越来越多研究者的关注,在肿瘤发生、发展和患者预后预测方面的作用在不断被发现,但有关其在肿瘤中的作用机制还研究甚少,其与乳腺癌发生、发展和转移的关系尚需进一步讨论。

参考文献:

- [1] Bingle L, Singleton V, Bingle C D. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms[J]. Oncogene, 2002,21(17):2768
- [2] Clauss A, Lilja H, Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein[J]. Biochem J, 2002,368(Pt 1):233
- [3] Galgano M T, Hampton G M, Frierson H F. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues [J]. Mod Pathol, 2006,19(6):847
- [4] Zou S L, Chang X H, Ye X, et al. Effect of human epididymis protein 4 gene silencing on the malignant phenotype in ovarian cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2011,124(19):3133
- [5] Li J, Chen H, Mariani A, et al. HE4 (WFDC2) promotes tumor growth in endometrial cancer cell lines[J]. Int J Mol Sci, 2013,14(3): 6026
- [6] Zhuang H, Tan M, Liu J, et al. Human epididymis protein 4 in association with Annexin II promotes invasion and metastasis of ovarian cancer cells[J]. Mol Cancer, 2014,13:243
- [7] Guo Y D, Wang J H, Lu H, et al. The human epididymis protein 4 acts as a prognostic factor and promotes progression of gastric cancer [J]. Tumour Biol, 2015,36(4):2457
- [8] Wang X, Fan Y, Wang J, et al. Evaluating the expression and diagnostic value of human epididymis protein 4 (HE4) in small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2014,35(7):6847
- [9] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma [J]. Cancer Res, 2003,63(13):3695
- [10] Clauss A, Ng V, Liu J, et al. Overexpression of elafin in ovarian carcinoma is driven by genomic gains and activation of the nuclear factor kappaB pathway and is associated with poor overall survival [J]. Neoplasia, 2010,12(2):161
- [11] Wang H, Zhu L, Gao J, et al. Promotive role of recombinant HE4 protein in proliferation and carboplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. Oncol Rep, 2015,33(1):403
- [12] Mccubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance[J]. Oncotarget, 2012,3(10):1068

(2015-03-12 收稿)