

文章编号 1006-8147(2015)01-0014-04

论著

Ebp1 的表达对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响

刘媛,袁杰,张洁,赵元元,牛瑞芳

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060)

摘要 目的:研究降低 Ebp1 的基因表达水平对乳腺癌细胞 T47D 野生型增殖能力和侵袭能力的影响。方法:转染并筛选 Ebp1 降表达的单克隆细胞株 clone1、clone2、clone3,阴性对照组命名为 control。应用小干扰 RNA(siRNA)技术降低 Ebp1 的表达,采用 Western blotting 技术检测 Ebp1 蛋白水平的变化,噻唑蓝(MTT)比色法和克隆形成实验观察其对 T47D 野生型细胞增殖能力和克隆形成能力的影响;采用 Matrigel 侵袭实验研究其对细胞侵袭能力的影响。结果:Western blotting 检测表明 siRNA 干扰后 T47D 野生型细胞中 Ebp1 的蛋白表达水平明显下降,且与亲本和 control 组细胞比较,Ebp1 降表达的细胞克隆的增殖能力和侵袭能力明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:Ebp1 表达下降可以明显促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力,提示 Ebp1 可能是乳腺癌增殖和侵袭的抑制性因子。

关键词 Ebp1;乳腺癌;增殖;侵袭

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Influence of the expression of Ebp1 on the proliferation and invasion of breast cancer cells

LIU Yuan, YUAN Jie, ZHANG Jie, ZHAO Yuan-yuan, NIU Rui-fang

(Cancer Institute and Hospital Tianjin Medical University, National Cancer Clinical Medicine Research Center, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To study the influence of the expression of Ebp1 on the proliferation and invasion of breast cancer cells. **Methods:** Western blotting and siRNA were applied to inspect and down-regulate the expression of Ebp1. The effect of proliferation and invasion of T47D wild type cells was examined by MTT assay, colony formation assay and transwell assay respectively. **Results:** The proliferation and invasion of T47D wild type could be promoted by knock-down of Ebp1 as compared to wild type group and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Down-regulation of Ebp1 facilitates the proliferation and invasion of breast cancer cells which suggest that Ebp1 may be an inhibiting factor for breast cancer.

Key words Ebp1; breast cancer; proliferation; invasion

乳腺癌是女性发病率最高的肿瘤之一,而肿瘤的浸润和转移是影响治疗效果和导致死亡的重要因素^[1]。Ebp1 是重组人增殖相关蛋白 2G4(proliferation-associated 2G4)家族的成员之一,最早是通过酵母双杂交从生长因子表皮受体 3(EGFR3)的跨膜区域分离得到,并且被鉴定为 ErBb3 的结合蛋白^[2]。Ebp1 在乳腺癌^[3]、肝癌^[4]、前列腺癌^[5]等多种肿瘤细胞中表达异常,参与调节细胞周期和细胞分化,是肿瘤增殖抑制因子。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 可引起 Ebp1 的 Ser360 的磷酸化与 ErbB3 发生结合,而当在 ErBb3 配体 HRG 的刺激下^[6],Ebp1 与 ErBb3 分离进入细胞核,与转录抑制因子 Rb^[7]、组蛋白脱乙酰酶 HDAC2^[8]、转录抑制因子 Sin3A^[9]相互作用,形成转录抑制复合体,从而导致与增殖相

关的蛋白如转录因子 E2F1、周期蛋白 Cyclin D1 和 Cyclin E 的表达受到抑制。目前 Ebp1 在乳腺癌中的研究已证实其对乳腺癌细胞 MCF-7 和 AU565 增殖的抑制作用^[10],但是其对乳腺癌迁移和侵袭的研究却较少。本研究利用小干扰 RNA(siRNA)技术降低增殖能力和侵袭能力都较弱的乳腺癌细胞 T47D 野生型中的 Ebp1 表达,观察降表达后对 T47D 野生型细胞的增殖和侵袭能力的影响,探究 Ebp1 影响乳腺癌增殖和侵袭的分子机制。

1 材料和方法

1.1 siRNA 质粒 Ebp1 特异性小干扰 RNA 购自吉凯基因公司,干扰序列为:5'-ATGCAGGACAGA-GAACCCTATTTCACA-3',对照组序列为:5'-AT-GCCAGCCAGGGAGAGTACAAGGCA-3'^[11],质粒的测序结果显示与定制序列一致。

1.2 细胞培养 人乳腺癌细胞 T47D 野生型 (American Type Culture Collection 细胞库)培养于含

作者简介 刘媛(1987-),女,硕士在读,研究方向:乳腺癌增殖和侵袭的分子机制研究;通信作者:牛瑞芳,E-mail: niur1982@yahoo.com.cn。

有 10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液,37 ℃、5%CO₂ 环境中,0.25% 的胰酶消化传代。

1.3 细胞系的建立

1.3.1 质粒转染 (1)取对数生长期的 T47D 野生型细胞以适当密度接种于 6 孔板内,使其 24 h 覆盖率达到 90%~95%,37 ℃、5%CO₂ 孵箱培养。(2)24 h 后用 1640 培养液将细胞饥饿 2 h,以提高转染效率。(3)将 siRNA 及对照质粒(序列长度与 siRNA 相同却无干扰意义)用 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司)进行转染。取质粒 10 μg,转染试剂 4 μL 分别稀释于 1640 培养液,静置 20 min 后混匀,缓慢滴加到 6 孔板内,37 ℃、5%CO₂ 孵箱培养。(4)转染 6 h 后更换新鲜培养液。

1.3.2 稳定克隆的筛选 (1)转染 48 h 后在荧光显微镜下观察细胞转染效率,并加入 150 mg/mL 的嘌呤霉素进行筛选,期间依据细胞状态和密度进行换液或传代。(2)筛选 2 周后,观察细胞荧光强度,并以有限稀释的方法筛选出 3 株稳定单克隆细胞,分别命名为 clone1、clone2、clone3,对照组命名为 control 组,嘌呤霉素浓度为筛选浓度的 1/2。(3)siRNA 的干扰效率以 Western blotting 检测。

1.4 Western blotting 检测 Ebp1 在细胞中的表达 将提取的细胞蛋白用 SDS-PAGE 胶电泳分离并转移至 PVDF 膜上。5%牛奶封闭 1 h 后室温孵育一抗 Ebp1 (1:1 000) (Milipore 兔抗),β-actin (1:2 000) (Santa Cruz 鼠抗) 2 h,室温孵育 HRP 标记的二抗(1:5 000) (Invitrogen 公司) 1 h;最后用 ECL 化学发光试剂和胶片曝光信号检测蛋白的表达水平。

1.5 噻唑蓝(MTT)检测细胞增殖能力 取对数生长期的 T47D 野生型细胞、control 细胞和 clone1、clone2、clone3 分别接种于 96 孔板中,贴壁后每 24 h 加入 20 μL 的 5 mg/mL MTT,继续孵育 4 h 后每孔加 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),酶标仪测量 570 nm 处的吸光度(OD 值),连续检测 5 d,每种细胞设置 5 个复孔,取其 OD 值的平均值。

1.6 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 取对数生长期的 T47D 野生型细胞、control 细胞和 clone1、clone2、clone3,分别以 500 个/孔接种于 6 孔板中,37 ℃、5%CO₂ 培养 2 周,每 3~4 d 更换新鲜培养液。2 周后,弃去培养液,用甲醇固定 10 min,0.000 5%结晶紫染色 30 min,显微镜下观察并计数克隆形成数目,以>50 个细胞为 1 个克隆。

1.7 Matrigel 侵袭实验检测细胞的侵袭能力 将 Matrigel (BD 公司)在 4 ℃缓慢解冻后与无血清的

DMEM 培养基以 1:4 的比例稀释,加入 Transwell(24 孔),50 μL/孔,放入 37 ℃温箱 30 min。将 150 μL 的 T47D 野生型细胞、control 细胞和 clone1、clone2、clone3 细胞悬液加入上室,细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL,将 300 μL 血清加入下室。37 ℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培育 24~36 h。利用三步染色试剂盒染色。在倒置显微镜下计数过膜细胞,光镜下(200×)随机选择 5 个视野计数取平均值。

1.8 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析,定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染效率验证 转染 48 h 后 siRNA 及对照质粒的转染效率如图 1 所示,siRNA 及 control 组转染效率都在 60%以上。clone1、clone2、clone3 经过嘌呤霉素筛选后荧光细胞比例高达 95%~100%,证明转染及筛选成功。

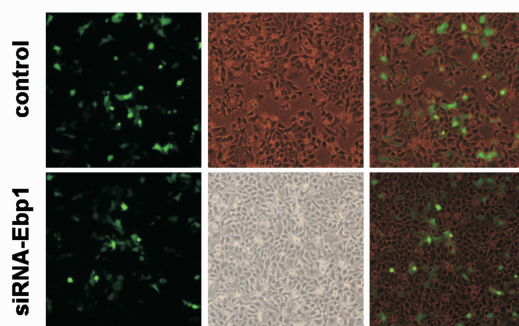


图1 干扰质粒及对照质粒的转染效率

Fig1 The transfection efficiency of small interference plasmid and control

2.2 siRNA 干扰 T47D 野生型细胞中 Ebp1 的表达水平 Western blotting 结果显示,与 T47D 野生型比较,应用特异性小干扰 RNA 处理挑取的 3 个克隆细胞株中 Ebp1 表达量明显降低,而对照组则没有差异(图 2)。

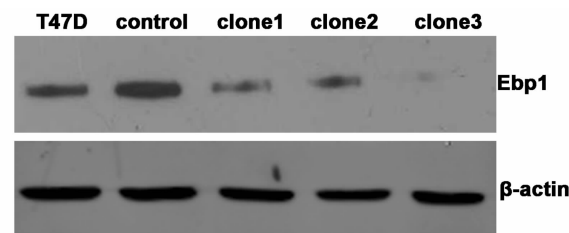
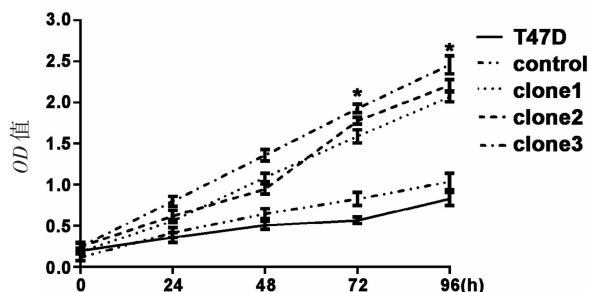


图2 Western blotting 检测 Ebp1 的表达

Fig2 The expression of Ebp1 detected by western blotting

2.3 降表达 Ebp1 增强 T47D 野生型细胞的增殖能力 用 MTT 法分别检测 T47D 野生型、control 组和 clone1、clone2、clone3 细胞在 0、24、48、72、96 h 的 OD 值,绘制生长曲线图(图 3),结果显示稳定细胞

系在 72、96 h 的生长速度明显高于 T47D 野生型和 control 组细胞 ($P < 0.05$), 而 T47D 野生型和对照组细胞间的增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。证明 Ebp1 的蛋白水平降低对 T47D 野生型细胞的增殖具有明显促进作用。



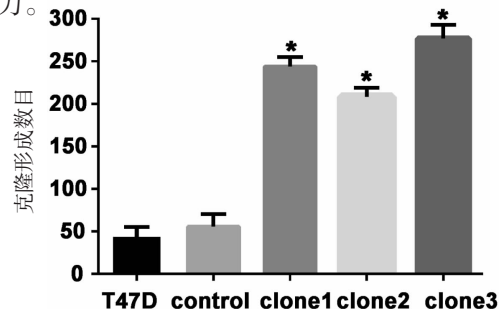
* 克隆组织细胞与野生型及对照组比较 $P < 0.05$

图 3 实验组和对照组细胞的生长曲线

Fig 3 The proliferation growth curves of T47D wild type, control, clone1, clone 2 and clone 3 cells

2.4 降表达 Ebp1 促进 T47D 野生型细胞的克隆形成能力 克隆形成计数结果显示, 与 T47D 野生型和对照组比较, clone1、clone2、clone3 细胞的克隆数目明显增多(图 4), 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组与 T47D 野生型之间无明显差异 ($P > 0.05$),

克隆直径也有明显的增加。表明降低 Ebp1 的蛋白表达提高了乳腺癌细胞系 T47D 野生型的克隆形成能力。



* 克隆组织细胞与野生型及对照组比较 $P < 0.05$

图 4 各组细胞的克隆形成数目

Fig 4 The colony number of T47D and clones which down-regulated the expression of Ebp1

2.5 降表达 Ebp1 提高 T47D 野生型细胞的侵袭能力 T47D 野生型和 control 组细胞穿透 Matrigel 的细胞数目明显低于 clone1、clone2、clone3 细胞, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 T47D 野生型组与 control 组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 结果显示干扰 Ebp1 的基因表达明显提高了 T47D 野生型细胞的侵袭能力(图 5)。

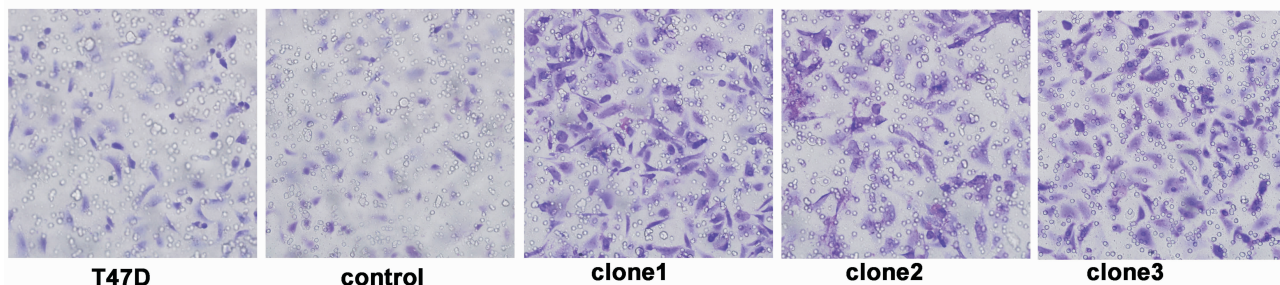


图 5 干扰 Ebp1 促进 T47D 细胞的体外侵袭能力 ($\times 200$)

Fig 5 The deletion of Ebp1 result in the increase of invasion ability of T47D cells ($\times 200$)

3 讨论

目前乳腺癌的治疗手段主要是手术、放疗, 但是预后的效果却并不理想, 这主要是由于肿瘤的浸润和转移, 因此研究乳腺癌浸润和转移的分子机制对于提高治疗效果意义重大^[12]。此外, 肿瘤细胞的恶性增殖的分子机制也是目前探究肿瘤治疗的热点。Ebp1, ErbB3 结合蛋白之一, 被证实是肿瘤的抑制因子, 其发生核转位后与 Rb、Sin3A、HDAC2 形成转录抑制复合体, 对肿瘤的增殖和迁移有重要的影响。研究报道, Ebp1 在 ErBb2/3 阳性的乳腺癌细胞 AU565 中的表达明显增高, 导致细胞 G2/M 期阻滞和分子分化, 是乳腺癌增殖的抑制因子^[10]。但是, Ebp1 对乳腺癌浸润转移的影响尚不明确, 因此, 本

研究着重研究了 Ebp1 对非浸润性乳腺癌细胞系 T47D 野生型的增殖和侵袭能力的影响。

Ebp1 在肝癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤组织中表达均降低, 降表达后肿瘤细胞的增殖能力显著增强, 本文我们特异性干扰 T47D 野生型细胞中 Ebp1 的蛋白表达量, MTT 实验结果和克隆形成实验结果都表明 Ebp1 降表达后 T47D 野生型的增殖能力有明显的增强作用, 说明 Ebp1 是乳腺癌增殖的抑制因子。但是, 我们又发现, 干扰 Ebp1 的基因表达水平后, T47D 野生型细胞的侵袭能力也有明显地提高。研究报道在唾液腺样囊性癌转移病灶包括淋巴、肺和神经组织中 Ebp1 含量低于原发病灶, 表明 Ebp1 与肿瘤细胞的迁移呈负相关^[13], 同样的结论在

肝癌^[14]、前列腺癌^[15]等肿瘤中也得到证实。我们的研究也证明在乳腺癌中 Ebp1 的降表达促进肿瘤的迁移和侵袭。在腺样囊性癌中证实 Ebp1 与 MMP-9 (金属蛋白酶 9) 和 E-cadherin 的表达呈负相关^[13], 因此推测 Ebp1 影响 T47D 野生型细胞的迁移和侵袭可能通过 MMPs 的激活和上皮间质转化,但是需要进一步的研究证实。

综上所述,本研究证实 Ebp1 的表达量下降后导致乳腺癌细胞增殖和侵袭能力增强,而其中的分子机制尚不明确。但是,Ebp1 对乳腺癌的影响为探究肿瘤的发生发展以及治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Zheng H, Li Y, Wang Y Z, et al. Downregulation of COX-2 and CYP 4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through preventing anoikis resistance, migration and invasion[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(1): 10
- [2] Yoo J Y, Wang X W, Rishi A K, et al. Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(3): 683
- [3] Lu Y, Zhou H, Chen W, et al. The ErbB3 binding protein EBP1 regulates ErbB2 protein levels and tamoxifen sensitivity in breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126(1): 27
- [4] Hu B Y, Xiong Y C, Ni R Z, et al. The downregulation of ErbB3 binding protein 1 (EBP1) is associated with poor prognosis and enhanced cell proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2): 175
- [5] Zhang Y, Linn D, Liu Z, et al. EBP1, an ErbB3-binding protein, is decreased in prostate cancer and implicated in hormone resistance[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(10): 3176
- [6] Liu Z X, Ahn J Y, Liu X, et al. Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(29): 10917
- [7] Zhang Y, Woodford N, Xia X, et al. Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(8): 2168
- [8] Akinmade D, Lee M, Zhang Y X, et al. Ebp1-mediated inhibition of cell growth requires serine 363 phosphorylation[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(4): 851
- [9] Ghosh A, Awasthi S, Hamburger A W. ErbB3-binding protein EBP1 decreases ErbB2 levels via a transcriptional mechanism[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3): 1161
- [10] Zhang Y X, Akinmade D, Hamburger A W. Inhibition of heregulin mediated MCF-7 breast cancer cell growth by the ErbB3 binding protein EBP1[J]. *Cancer Lett*, 2008, 265(2): 298
- [11] Kim C K, Nguyen T L, Joo K M, et al. Negative regulation of p53 by the long isoform of ErbB3 binding protein Ebp1 in brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9730
- [12] Chen J J, Peck K, Hong T M, et al. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5223
- [13] Sun J, Luo Y X, Tian Z, et al. Expression of ERBB3 binding protein 1 (EBP1) in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinicopathological relevance[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 499
- [14] Zhang Y X, Ali T Z, Zhou H, et al. ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 240

(2014-08-11 收稿)

(上接第 8 页)

- [5] Ataie A, Ataee R, Shadifar M, et al. Interaction of memantine with homocysteine on the apoptosis in the rat hippocampus cells[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2012, 1(3): 145
- [6] Lee S J, Kang M H, Min H. Folic acid supplementation reduces oxidative stress and hepatic toxicity in rats treated chronically with ethanol[J]. *Nutr Res Pract*, 2011, 5(6): 520
- [7] Fiorito G, Guarerra S, Valle C, et al. B-vitamins intake, DNA-methylation of One Carbon Metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(5): 483
- [8] Guo H Y, Xu F K, Lü H T, et al. Hyperhomocysteinemia independently causes and promotes atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2014, 11(1): 74
- [9] 程丝,冯娟,王宪.高同型半胱氨酸血症治疗研究进展[J].*生理科学进展*, 2011, 42(5): 329
- [10] Parmar M S, Jaumotte J D, Wyrostek S L, et al. Role of ERK1, 2, and 5 in dopamine neuron survival during aging[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(3): 669
- [11] Matteucci A, Gaddini L, Villa M, et al. Neuroprotection by rat Müller glia against high glucose-induced neurodegeneration through a mechanism involving ERK1/2 activation[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 20
- [12] Yang K, Cao F J, Sheikh A M, et al. Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development[J]. *Brain Struct Funct*, 2013, 218(3): 669
- [13] Ortuno-Sahagún D, González R M, Verdaguer E, et al. Glutamate excitotoxicity activates the MAPK/ERK signaling pathway and induces the survival of rat hippocampal neurons in vivo[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 52(3): 366
- [14] Türkçü F M, Koz O G, Yarangümeli A, et al. Plasma homocysteine, folic acid, and vitamin B₁₂ levels in patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and normotensive glaucoma[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2013, 49(5): 214
- [15] Zhang X M, Huang G W, Tian Z H, et al. Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells[J]. *Nutr Neurosci*, 2009, 12(5): 226
- [16] Zhang X M, Huang G W, Tian Z H, et al. Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45(1): 14
- [17] Cao H, Hu X H, Zhang Q, et al. Hyperhomocysteinemia, low folate concentrations and MTHFR C677T mutation in abdominal aortic aneurysm[J]. *Vasa*, 2014, 43(3): 181
- [18] 周小红,刘向一.脑梗塞患者血清叶酸浓度的改变[J].*中华临床医学杂志*, 2006, 7(8): 49

(2014-07-30 收稿)