

乳腺癌侵袭转移中 Artemin 作用的探讨

张路漫^{1,2}, 田 刚², 魏殿军^{3,4}

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市公安医院检验科, 天津 300010; 3.天津医科大学第二医院检验科, 天津 300211; 4.天津医科大学医学检验学院, 天津 300010)

摘要 目的:探讨 Artemin 对乳腺癌侵袭转移的作用与意义。方法:采用免疫组织化学方法对乳腺癌组织切片进行 Artemin 表达分析。以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,通过 siRNA 技术降低内源性 ARTN 的水平获得 siATRN-MDA231 稳定克隆细胞,通过 Western blot 技术验证 siATRN-MDA231 稳定克隆细胞 ARTN 表达水平变化。通过划痕和趋化运动实验观察细胞迁移和定向运动能力的变化。通过粘附和侵袭实验观察 siATRN-MDA231 细胞粘附功能以及侵袭能力变化。结果:乳腺癌组织中 Artemin 表达水平与肿瘤大小无关,但与淋巴结转移关系密切。siATRN-MDA231 细胞 Artemin 的蛋白表达量明显比对照组降低,通过划痕和趋化实验显示肿瘤细胞的运动能力显著降低。细胞的粘附功能和侵袭水平也有不同程度减低。结论:Artemin 参与 EGF 诱导的乳腺癌细胞的运动和侵袭。

关键词 乳腺癌;Artemin;侵袭;转移;表达**中图分类号** R73**文献标志码** A

近年来由于工作节奏的加快和生活环境的变迁,影响女性身心健康的恶性肿瘤发病呈上升趋势,据不完全统计生殖系统恶性肿瘤占女性新发癌症总数的将近一半。乳腺癌居女性各类恶性肿瘤死亡率之首,侵袭转移是恶性肿瘤加重病情变化的主因,如何早期发现乳腺癌病灶,抑制瘤细胞血道淋巴道远端转移成为各研究机构的焦点问题。神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)家族配体中 Artemin (ARTN)作用独特,目前的研究表明,ARTN 是一个癌基因,在不同的肿瘤组织中表达水平有所不同,该基因在肿瘤组织中的异常激活可能与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移相关^[1]。ARTN 在乳腺癌侵袭转移中的作用,国内尚少见报道。本研究试图从 ARTN 角度探索其与乳腺癌侵袭转移的关系,为早期诊断乳腺癌遏制其发生提供一些有价值数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本和细胞系 乳腺癌组织标本来自天津市公安医院 2000 年 6 月-2010 年 6 月手术切除的 39 例乳腺癌患者。其对应的乳腺癌旁正常组织标本作为对照组。调阅住院乳腺癌患者病历,结合随访资料完善基本资料分析。乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株由天津医科大学实验中心惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 细胞培养基(Hyclone 公司);Artemin (abcam Biotechnology 公司);兔抗人

β -actin 多克隆抗体(Invitrogen 公司)。超净工作台(细胞培养专用,中国 Air Tech);Olympus IX70 倒置显微镜(日本 Olympus);转膜仪:(Bio-Rad);凝胶成像系统(Kodak 440CF);ID KODAK 凝胶成像系统(美国 Kodak 公司);Transwell 小室(美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 用含 10% NBS、100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中每 48 h 更换培养液 1 次。细胞进入对数生长期后,胰酶消化成熟细胞后清洗死细胞,用 1 mL 完全培养基终止消化后吹打为单细胞悬液,接种到 6 孔板内继续培养准备后序试验。

1.2.2 siRNA 质粒转染 把对数生长期的适量细胞平铺到培养皿中,温箱培养 24 h;用移液枪旋转加入 1.6 μ g 质粒和 4 μ L Lipofectamin 2000,混匀后室温放置 20 min;细胞表面滴加质粒 DNA-脂质体复合物,轻轻摇匀培养皿后放 5%CO₂ 孵化箱内培养,6 h 后换成普通 1640 培养液;细胞转染 24 h 后传代;贴壁细胞加入 Hygromycin B,荧光筛选单克隆细胞^[2]。

1.2.3 免疫组化检测 Artemin 表达 应用免疫组化检测临床乳腺癌标本石蜡切片中 Artemin 蛋白表达情况。按照操作说明书进行,染色浅黄至棕黄色为阳性细胞。

1.2.4 划痕实验 细胞平铺 6 孔培养板孵育过夜,待细胞对数生长期铺满培养皿后,沿比例尺用移液枪对培养基中贴壁细胞划线。散落的破碎细胞用

基金项目 天津市公安局科技基金资助项目(2013KYSAGY035)

作者简介 张路漫(1983-),女,检验技师,硕士在读,研究方向:临床检验诊断;通信作者:魏殿军,E-mail: weidianjun01@163.com。

PBS 冲洗,加入无血清培养基放培养箱中饥饿细胞。0、6、9、12、24 h 测量划痕处细胞愈合距离,不同的测定取均值后绘制曲线。

1.2.5 趋化运动实验 在趋化小室的下室加入用含 0.5%精制胎牛血清的培养液配置不同浓度的 EGF 溶液,混匀的细胞悬液加入上室。37 °C CO₂ 培养箱孵育 2 h 后弃去未粘附细胞,固定染色后倒置显微镜下观察穿膜细胞。

1.2.6 粘附实验 细胞消化计数后离心,重悬于培养基配成密度为 2.7×10^5 个/mL 细胞悬液。不同浓度 EGF 刺激后冰浴终止反应,固定染色后镜下计数粘附细胞数。

1.2.7 细胞侵袭实验 Transwell 小室中加入已融化的 Matrigel 胶。将细胞重调浓度加入上室,下室加入含 10%血清的培养基,37 °C 孵育 48 h 后,去除未穿膜的细胞,固定细胞后结晶紫染色,显微镜下观察穿膜细胞数。

1.3 统计学分析 研究资料用 SPSS 11.0 软件进行处理,组间比较采用方差分析或 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 免疫组化检测 Artemin 在乳腺癌组织中表达 39 例乳腺疾病患者其中淋巴结转移的 26 例,淋巴结未转移的 13 例。在 26 例淋巴结转移病例中,有 24 例 Artemin 表达阳性($P=0.003$)。然而,在无淋巴结转移 13 例病例中,只有 1 例 Artemin 表达阳性(图 1)。提示 Artemin 的表达与乳腺癌转移具有相关性。本研究未发现 Artemin 的表达与肿瘤大小有关。

正常乳腺组织

浸润性乳腺导管癌

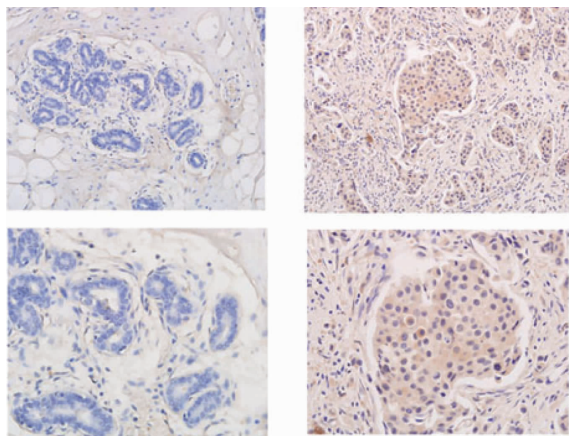


图 1 Artemin 在正常乳腺组织和浸润性乳腺导管癌中的表达(上:10 \times ;下:20 \times)

Fig 1 Artemin expression in normal breast tissue and invasive ductal carcinoma (up:10 \times ;down:20 \times)

2.2 siRNA 技术分析 MDA-MB-231 细胞中 Artemin 表达情况

2.2.1 Artemin 降表达的 MDA-MB-231 细胞蛋白表达水平 稳定转染 MDA231 细胞而获得 siATRN-MDA231,同时用一段无关序列转染 MDA231 细胞作为阴性对照(scr 表示)。用 Western blot 检测 Artemin 的表达情况。和 scr/MDA231 细胞比较,siATRN-MDA231 细胞 Artemin 的蛋白表达水平明显降低。

2.2.2 Artemin 表达降低对 MDA-MB-231 细胞迁移和定向运动能力影响 siATRN-MDA231 细胞迁移和定向运动能力明显比对照组降低(图 2)。

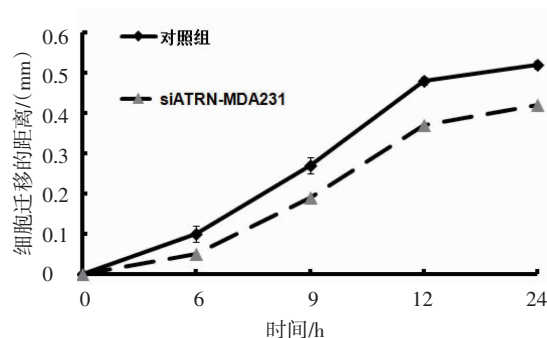


图 2 Artemin 表达降低对 MDA-MB-231 细胞迁移和定向运动能力的影响

Fig 2 Effect of Artemin down-expression on migration and directional movement of MDA231

2.2.3 Artemin 降表达对细胞趋化运动影响 Artemin 降表达的细胞趋化运动能力降低(图 3)。

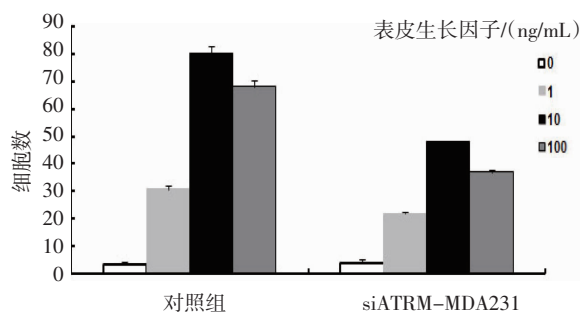


图 3 Artemin 降表达对细胞趋化运动的影响

Fig 3 Effect of Artemin on down-expression on chemotaxis of MDA231

2.2.4 Artemin 降表达对 MDA231 细胞粘附能力影响 粘附于纤维粘连蛋白的 scr/MDA231 细胞数量在 EGF 刺激下经 5 和 15 min 的不同间隔明显增加。siATRN-MDA231 细胞经过相同的 EGF 刺激时间间隔有较少的数量增加(图 4)。

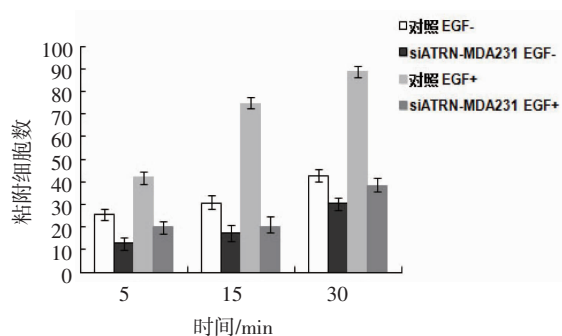


图4 Artemin 降表达对 MDA231 细胞粘附能力影响

Fig 4 Effect of Artemin down-expression on adhesion of MDA231

2.2.5 siATRN-MDA231 细胞侵袭能力观察 对照组和 siATRN-MDA231 细胞平均视野侵袭细胞数量之比为 250.65/52.22 个, siATRN-MDA231 细胞穿透 matrigel 胶的能力明显低于对照组, 与对照组相比侵袭能力下降了 76.5 % ($P < 0.01$) (图 5)。

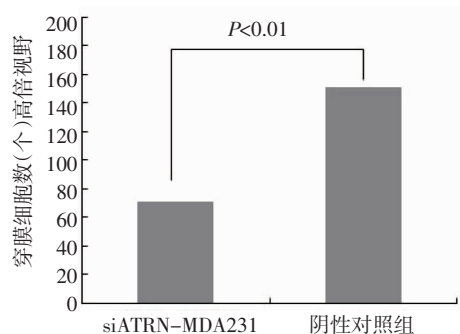


图5 siATRN-MDA231 细胞侵袭能力变化

Fig 5 Change in invasion of siATRN-MDA231 cells

3 讨论

在西方乳腺癌是最普通的恶性肿瘤之一, 在患有恶性肿瘤的妇女死亡病例中位于第二位。近年来我国乳腺癌的发病率有上升的趋势。如何预防乳腺癌发病, 特别能尽早有效抑制癌细胞转移, 是治疗乳腺癌的关键问题。

Artemin (ARTN) 是一种神经胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族配体, 目前的研究表明, ARTN 是一个癌基因, 在不同的肿瘤组织中表达水平有所不同, 该基因在肿瘤组织中的异常激活可能与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移相关^[3]。研究表明: ARTN 与非神经源性恶性肿瘤发生关系密切^[4]。近年来研究发现 ARTN 在消化系统和呼吸系统恶性肿瘤中的表达能够促进癌细胞的侵袭能力, 进一步的研究证实 ARTN 是神经旁分泌的重要调控因子^[5]。在生殖系统恶性肿瘤的研究中外学者研究证实 ARTN 在多个乳腺癌细胞系中表达, 过表达该基因的乳腺癌细胞的克隆形成能力、侵袭能力均明显增加; 高表达 ARTN 的患者总生存率明显低于阴性患者, 且

与肿瘤的复发、远端转移相关^[6]。在子宫内膜癌中的表达明显高于正常的子宫内膜组织, 进一步的研究表明, 子宫内膜癌细胞高表达 ARTN 增加细胞的侵袭能力可能与 AKT1 表达水平的增高相关^[7]。

本研究对乳腺浸润性导管癌组织切片进行免疫组化分析发现, Artemin 在有无淋巴结转移的乳腺癌组织中表达差别明显, 有淋巴结转移的乳腺癌组织处 Artemin 染色深棕黄色, 预示表达水平偏高。说明 Artemin 的表达水平的高低与淋巴结转移与否关系密切。这些充分印证 Artemin 参与肿瘤的发生和转移。

在乳腺癌细胞系 MDA231 中, 下调 Artemin 的乳腺癌细胞的迁移和定向运动能力与对照组相比明显降低, 乳腺癌细胞的趋化和粘附能力也显著下降。siATRN-MDA231 细胞穿透 matrigel 胶的能力明显低于对照组, 与对照组相比侵袭能力下降了 76.5 % ($P < 0.01$)。表明 Artemin 对乳腺癌的侵袭和转移作用是不可或缺的。

乳腺癌发病机制主要涉及肿瘤细胞的粘附、迁移、细胞外基质降解、新生血管形成及癌基因和肿瘤抑制基因的异常表达等方面。癌细胞基因调控存在于染色体水平、转录水平、翻译水平中一个或多个层次, 其中以转录水平的调控最为重要。ARTN 在乳腺癌侵袭转移中的作用, 国内尚少见报道。本研究试图从 ARTN 角度探索其与乳腺癌侵袭转移的关系, 为遏制乳腺癌发生提供一些有价值的信息。

参考文献:

- [1] 陈雅琪, 文彬. ARTN 在恶性肿瘤发生发展中的作用研究进展[J]. 川北医学院学报, 2016, 31(3): 439
- [2] Tian G, Wang X, Zhang F, et al. Downregulation of cPLA2 γ expression inhibits EGF-induced chemotaxis of human breast cancer cells through Akt pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 409(3): 506
- [3] Ding K, Banerjee A, Tan S, et al. Artemin, a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of ligands, is HER2-regulated and mediates acquired trastuzumab resistance by promoting cancer stem cell-like behavior in mammary carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(23): 16057
- [4] 缪锦峰, 吴仟, 曹磊, 等. GDNF 和 ARTN 及其受体与消化系统肿瘤嗜神经侵袭的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(1): 68
- [5] 马耀先. Artemin 蛋白在胃癌组织中的表达及其与胃癌临床病理特征的关系[J]. 海南医学, 2015, 26(16): 2355
- [6] Gao C, Cheng X, Li X, et al. Prognostic significance of artemin and GFR α 1 expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3): 818
- [7] 王晓华, 张玉娟, 周晓慧, 等. 靶向干扰 ARTN 对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖能力的影响[J]. 承德医学院学报, 2017, 34(5): 369

(2018-01-10 收稿)