

沉默同源异型盒基因 2 表达对乳腺癌增殖的影响及其分子机制

吕志栋¹ 杨召川² 金丽英³ 聂刚¹ 王圆媛¹ 孔滨¹ 王海波¹

¹青岛大学附属医院乳腺病诊疗中心, 青岛 266000; ²青岛大学附属医院儿童保健科, 青岛 266000; ³青岛大学附属医院脑科研究所, 青岛 266000

通信作者: 王海波, Email: qingyiwhb@126.com

【摘要】目的 观察沉默同源异型盒基因 2(Prrx2)表达后对乳腺癌细胞增殖和肿瘤生长的影响及其分子机制。**方法** 以人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 作为研究对象, 构建稳定沉默 Prrx2 表达的细胞株。采用 MTT 法分析癌细胞的增殖情况; 裸鼠移植瘤实验观察沉默 Prrx2 表达对肿瘤生长的影响; Western 印迹分析沉默 Prrx2 表达后 β -连环链蛋白(catenin)在细胞内的分布变化。**结果** 转染干扰载体后 MDA-MB-231 细胞 Prrx2 表达下降 91.2%; MCF-7 细胞表达下降 88.7%, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 实验显示沉默 Prrx2 表达后癌细胞的增殖能力明显减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。裸鼠移植瘤实验发现沉默组的移植瘤体重明显小于空白载体组(160.2 ± 26.3)mg 与 (365.4 ± 19.7)mg, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western 印迹检测发现沉默 Prrx2 表达可抑制 β -catenin 在乳腺癌细胞核中的表达, 下调 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。**结论** 沉默 Prrx2 表达可有效抑制乳腺癌的增殖和肿瘤生长能力, 针对 Prrx2 的治疗可能成为治疗乳腺癌的新靶点。

【关键词】 乳腺肿瘤; 同源异型盒基因 2; 增殖; 信号通路

基金项目: 国家自然科学基金(81700029); 青岛市应用基础研究计划项目(19-6-2-54-cg); 齐鲁卫生与健康领军人才项目

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190710-01309

Effects of Prrx2 gene silencing on the proliferation of breast cancer and its molecular mechanisms

Lü Zhidong¹, Yang Zhaochuan², Jin Liying³, Nie Gang¹, Wang Yuanyuan¹, Kong Bin¹, Wang Haibo¹

¹Breast Centre, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; ²Departments of Child Health Care, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; ³Cerebrovascular Disease Research Institute, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China

Corresponding author: Wang Haibo, Email: qingyiwhb@126.com

【Abstract】Objective The aim of this study was to investigate the effects of silencing Paired related homoeobox 2 (Prrx2) expression on the proliferation of breast cancer and its molecular mechanisms. **Methods** Short hairpin RNA knockdown of Prrx2 was used to examine cellular effects of Prrx2. The level of Prrx2 was verified by Western blot. MTT assay was used to analyze the proliferation of breast cancer cells *in vitro*. To investigate the effect of Prrx2 depletion on tumor growth *in vivo*, a nude mouse xenograft model was performed. **Results** The expression of Prrx2 decreased 91.2% in MDA-MB-231 cells and 88.7% in MCF-7 cells after transfection with interfering vectors ($P < 0.05$). MTT assay showed that the proliferation of cells in silenced Prrx2 expression group was significantly inhibited compared with the control group ($P < 0.05$). Nude mice transplanted tumors showed that the growth of transplanted tumors was slow after silencing Prrx2 expression, and the weight of the tumors of silenced Prrx2 expression group were smaller than those of the control group (160.2 ± 26.3)mg vs (365.4 ± 19.7)mg, $P < 0.05$). Western blot showed that silencing Prrx2 expression inhibited the expression of β -catenin in breast cancer cell nucleus and down-regulated the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Conclusions** Silencing Prrx2 expression can effectively inhibit the proliferation and growth of breast cancer, suggesting that Prrx2 may become a new target for the treatment of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Paired related homoeobox 2; Proliferation; Signaling pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81700029); Qingdao Applied Basic

Research Project (19-6-2-54-cg); Qilu Medical and Health Leading Talent Project

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190710-01309

近年来我国乳腺癌的发病率有上升的趋势,对妇女的身体和生命健康构成严重的威胁^[1]。同源异型盒基因 2(Prrx2)定位于人类染色体 9q34,编码由 253 个氨基酸组成的蛋白质。既往有研究发现 Prrx2 作为转化生长因子(TGF)- β 1 诱导因子增强乳腺癌的侵袭和迁移能力^[2]。近期研究证实 Prrx2 的表达与急性髓性白血病有关,在胃恶性肿瘤 Prrx2 可以作为一种新的转录因子促进肿瘤的侵袭转移^[3],但 Prrx2 在乳腺癌中的生物学功能及具体作用机制尚不明确。本研究拟探讨沉默 Prrx2 表达对乳腺癌细胞增殖和肿瘤生长的影响,旨在揭示 Prrx2 在乳腺癌中的功能和分子机制。

材料与方法

1. 材料:DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 GIBCO BRL 公司。兔抗人 Prrx2- β -(连环链蛋白)catenin 单克隆抗体及二抗购自美国 Sigma 公司,其余试剂购自美国 Santa Cruz 公司。

2. 细胞培养:人乳腺癌细胞株 MCF-7、T47D、MDA-MB-231、HCC-1937 和人乳腺导管上皮细胞 MCF-10A 购自中国科学院细胞库(上海)。所有细胞由本课题组保存培养并鉴定。细胞培养在青岛大学分子遗传学重点实验室进行。

3. Prrx2 干扰 RNA 重组慢病毒载体构建:按 shRNA 设计原则和 GeneBank 提供的 Prrx2 (Gen Bank, No. NM_016307.4)基因序列,利用 Invitrogen 公司的 RNAi web 设计程序(<https://maidesigner.invitrogen.com/maidesigner/>)设计了 Prrx2 的 shRNA 序列,并经 BLAST 进行验证(表 1)。干扰质粒的构建和慢病毒包装由上海生工公司合成并鉴定。本实验中共设计合成 3 条 Prrx2 编码序列的反向重复序列和 1 条对照序列,分别为 Prrx2-shRNA1、Prrx2-shRNA2、Prrx2-shRNA3 和 Scrambled-shRNA,序列如下(表 2)。

表 1 Prrx2 引物序列

引物名称	引物序列
Prrx2 F	GCCTTTGTGCGGAGGAGCTT
Prrx2 R	TTCATTCTGCGGAAGCTTGCCG
GAPDH F	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGCC
GAPDH R	TGTGTCATGAGTCTCCACGAT

表 2 3 条 Prrx2 编码引物及序列

引物名称	序列
Prrx2-shRNA1	GCCAAGTTCGGCAGGAATGAA
Prrx2-shRNA2	ACCGCCCTGAGTCCAGATTAT
Prrx2-shRNA3	CTGGGTGGACAGCAATAGAAA
Scrambled-shRNA	TTCTCCGAACGCTGTCACGT

4. Western 印迹检测:按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明(碧云天生物公司)提取细胞总蛋白和核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,以 12% 十二烷基酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入兔抗人 Prrx2 单克隆抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜,加入碱性磷酸酶标记的二抗室温下孵育 2 h,最后滴加 ECL 液显色,曝光拍照。

5. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):TRIzol 法(美国 Invitrogen 公司)提取 mRNA,逆转录后扩增 cDNA,引物序列见(表 2)(上海吉凯公司合成)。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像及扫描定量分析,以所得积分吸光度与内参照积分吸光度(A)值的比值代表半定量值。

6. 细胞增殖活力分析(MTT 法):按照既往报道方法^[4],细胞转染重组慢病毒 48 h 后,用胰酶消化调整细胞浓度至 6×10^4 /ml,接种至 96 孔板中,置于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中每隔 24 h 取一批细胞进行如下实验:换 DMEM 完全培养基,加入 MTT 使其终浓度为 0.5 mg/ml,4 h 后弃除上清液,加 DMSO 150 μ l/孔,摇晃反应约 10 min。于酶标仪 570 nm 波长处检测 A 值。

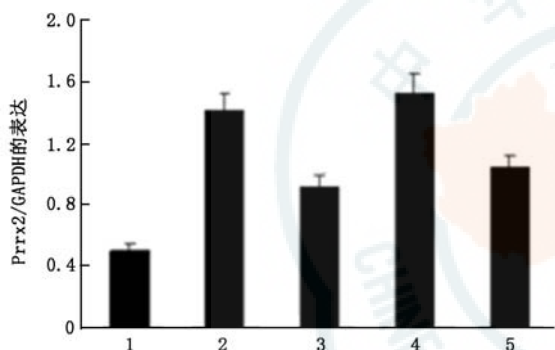
7. 动物移植瘤实验:选用 SPF 级 6 周龄、雌性 BALB/nu 裸鼠,体重在 15~20 g,购买自上海 SLAC 公司,动物实验通过青岛大学附属医院伦理委员会批准。安尔碘溶液消毒皮肤,取 50 μ l 细胞悬液(约 4×10^6 个细胞)摇匀后用皮试针从一侧背部刺入皮下注射,生理盐水替代作为空白对照组,每组 8 只。记录裸鼠的一般情况(如体重、精神状态等)、活动能力、摄食、腹水等情况。观察种植瘤的生长情况并测量体积,绘制生长曲线。6 周后脱臼法处死裸鼠,完整切除瘤体,测量肿瘤重量和体积。

8. 统计学处理:统计学处理分析采用 SPSS 17.0 统计软件完成,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均

数比较采用单因素方差分析,多组均数间两两比较采用 LSD 或 SNK 法。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 筛选 Prrx2 在乳腺癌细胞系中的表达差异: RT-PCR 显示 Prrx2 在乳腺导管上皮细胞 MCF-10A 和 4 种乳腺癌细胞系 MCF-7、T47D、MDA-MB-231 和 HCC-1937 中均有表达,其中 MCF-7、MDA-MB-231 两种细胞中表达量相对较高(图 1)。因此,我们筛选出 MCF-7、MDA-MB-231 细胞用于后续沉默研究。

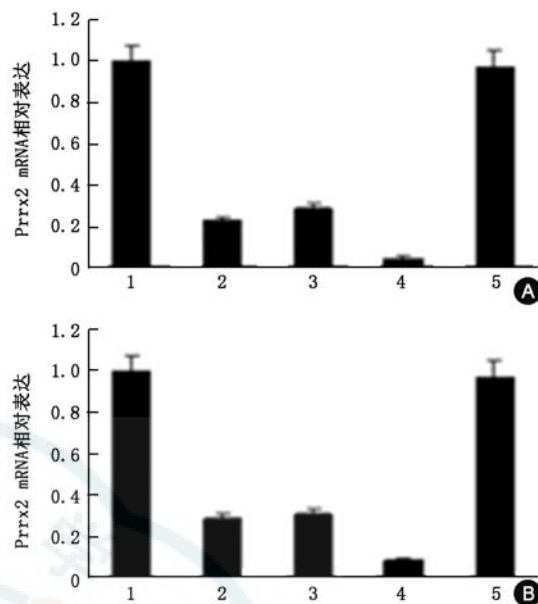


注: 1: MCF-10A, 2: MCF-7, 3: T47D, 4: MDA-MB-231, 5: HCC-1937

图 1 Prrx2 mRNA 在乳腺导管上皮细胞 MCF-10A 和 4 种乳腺癌细胞系中的表达

2. 评估 Prrx2 慢病毒干扰载体转染效率: 为了确保慢病毒干扰载体的有效转染,我们验证了 Prrx2 慢病毒干扰载体的转染效率。结果发现 Prrx2 慢病毒干扰载体转染乳腺癌 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞 72 h 后,在倒置荧光显微镜下发现报告基因 GFP 的转染效率达到 90% 以上,镜下细胞内可看到强绿色的荧光颗粒,同时乳腺癌细胞生长状态良好,说明转染条件合适,符合实验的要求。

3. 分析 Prrx2 慢病毒载体的干扰效率: 为了考察 Prrx2 慢病毒干扰载体的干扰效率,我们将 3 个慢病毒干扰载体转染至乳腺癌细胞中,RT-PCR 结果发现 3 号分子干扰效率最高(图 2)。Western 印迹结果发现乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞转染慢病毒干扰体后,在 MDA-MB-231 细胞中 Prrx2 蛋白表达下降幅度达到 91.2%;MCF-7 细胞中 Prrx2 蛋白表达下降幅度达到 88.7%,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。



1: 对照组, 2: Prrx2-shRNA1, 3: Prrx2-shRNA2, 4: Prrx2-shRNA3, 5: Scrambled-shRNA

图 2 RT-PCR 检测慢病毒干扰载体对乳腺癌细胞的干扰效率(A: MCF-7, B: MDA-MB-231 细胞株)

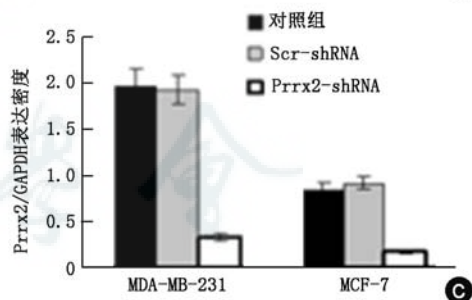
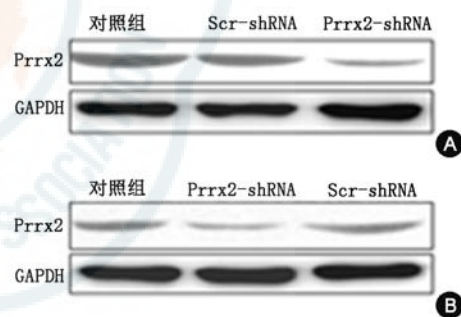


图 3 Western 印迹检测 Prrx2 慢病毒干扰载体转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 (A)、MCF-7 (B) 后 Prrx2 蛋白表达 (C: 对 Prrx2 慢病毒干扰载体转染组、阴性对照组和空白载体组 Prrx2 蛋白表达)

4. 沉默 Prrx2 表达下调乳腺癌细胞增殖和肿瘤生长能力: MTT 实验表明沉默 Prrx2 表达后 MDA-MB-231、MCF-7 细胞的生长速度慢于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而阴性对照组、空载体组细胞增殖能力无明显变化($P > 0.05$)(图 4)。为研究沉默 Prrx2 表达对体内肿瘤生长的影响,我

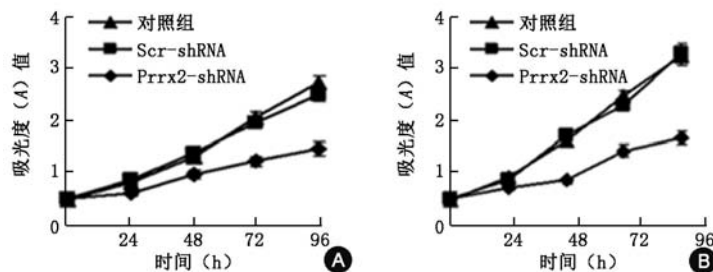


图4 MTT 检测沉默 Prrx2 表达后对乳腺癌细胞增殖的影响(A:乳腺癌细胞 MCF-7, B:乳腺癌细胞 MDA-MB-231)

们将稳定沉默 Prrx2 表达的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞注射到裸鼠皮下构建移植瘤模型。结果显示沉默组的瘤体重量明显小于空白载体组(160.2±26.3) mg 与(65.4±19.7)mg ($P < 0.05$) (图 5)。阴性对照组和空载载体组肿瘤的生长能力未见明显变化 ($P > 0.05$)。

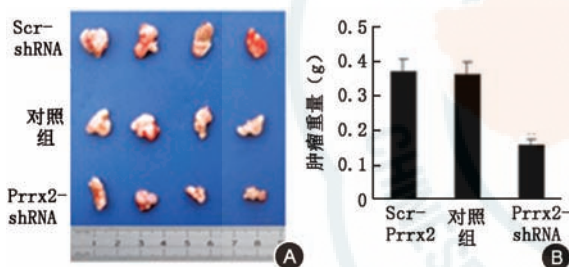


图5 体内实验观察沉默 Prrx2 表达后对乳腺癌细胞生长能力的影响(A:3 只裸鼠移植瘤, B:肿瘤重量)

5. 沉默 Prrx2 表达能够抑制细胞核中 β -连环蛋白(catenin)表达:我们采用 Western 印迹分析沉默 Prrx2 表达时 β -catenin 蛋白的表达水平和位置的变化,探讨沉默 Prrx2 表达对 Wnt/ β -catenin 通路的影响。如图 6 所示,沉默 Prrx2 表达后总蛋白中 β -catenin 的数量没有明显变化,细胞核中 β -catenin 蛋白的表达量明显降低。提示沉默 Prrx2 表达后抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。

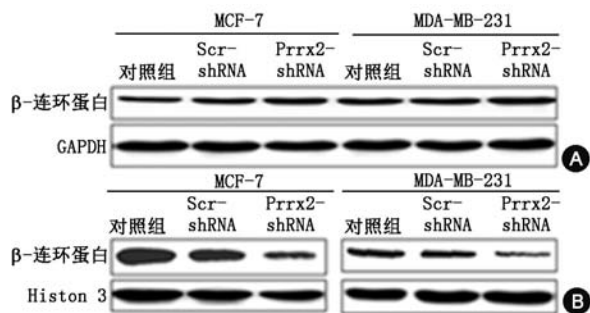


图6 Western 印迹检测沉默 Prrx2 表达后 β -catenin 在乳腺癌细胞中的表达(A:乳腺癌总蛋白, B:细胞核蛋白)

讨 论

有证据表明配对相关的同源异型盒蛋白家族可参与细胞生长、肿瘤免疫逃逸和转移瘤血管生成等在肿瘤进展和治疗耐药中发挥作用^[5]。同源异型盒基因 Prrx2 定位于人类染色体 9q34, 编码由 253 个氨基酸组成的蛋白质^[6]。既往研究报道 Prrx2 作为 TGF- β 1 的协同因子参与乳腺癌的侵袭和迁移过程^[2]; 亦有研究发现 Prrx2 的表达与急性髓性白血病有关, 在胃恶性肿瘤研究发现 Prrx2 可以作为一种新的转录因子促进肿瘤的侵袭和转移进程^[3], 但 Prrx2 在乳腺癌中的生物学功能及其分子机制尚不明确。

在本研究中我们首先成功构建了沉默 Prrx2 表达的稳定乳腺癌细胞株。功能学实验表明沉默 Prrx2 表达后肿瘤细胞的增殖能力显著降低, 同时体内肿瘤生长受到明显抑制。说明沉默 Prrx2 表达可以降低乳腺癌的增殖和生长能力。

β -catenin 是经典 wnt 信号传导通路重要的核信号蛋白, 其表达量的高低直接影响 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性^[7-8]。当细胞受到外界信号刺激时, 分泌型糖蛋白 Wnt 可与细胞表面卷曲蛋白结合, 与低密度脂蛋白相关受体蛋白 5 和 6 发挥协调作用, 将胞浆中的松散蛋白募集到胞膜内并将其磷酸化, 使降解复合体解散, 蛋白激酶 A 磷酸化失活, β -catenin 因无法磷酸化而降解减少^[9-10]。当 β -catenin 在细胞浆中集聚到一定程度时, 浓度梯度促使 β -catenin 进入细胞核, 在核内与转录调控因子 TCF/LEF 相结合形成复合体, 启动对目标基因的转录调控, 发挥转录因子作用^[11]。本课题研究中, 我们分析发现沉默 Prrx2 表达后 β -catenin 在乳腺癌总蛋白表达未见明显变化, 而其在细胞核中的表达降低。说明沉默 Prrx2 表达可以下调 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。

总之, 我们研究发现沉默 Prrx2 表达后可明显抑制乳腺癌细胞的增殖和肿瘤生长能力, 同时下调 Wnt/ β -catenin 信号传导通路的活性, 初步揭示 Prrx2 在乳腺癌中的功能及其分子机制, 推测针对 Prrx2 的治疗可能成为治疗乳腺癌的新靶点。

利益冲突 本文所有作者均声明不存在利益冲突

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. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] Juang YL, Jeng YM, Chen CL, et al. PRRX2 as a novel TGF- β -induced factor enhances invasion and migration in mammary epithelial cell and correlates with poor prognosis in breast cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12): 2247-2259.
- [3] Ueharu H, Higuchi M, Nishimura N, et al. Expression of Krüppel-like factor 6, KLF6, in rat pituitary stem/progenitor cells and its regulation of the PRRX2 gene[J]. *J Reprod Dev*, 2014, 60(4): 304-311. DOI: 10.1002/mc.22465.
- [4] 陆惠平, 马芬芬, 龚婧如, 等. 冬凌草甲素联合卡培他滨对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(46): 3647-3651. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.46.011.
- [5] Du B, Cawthorn WP, Su A, et al. The transcription factor paired-related homeobox 1 (Prrx1) inhibits adipogenesis by activating transforming growth factor- β (TGF β) signaling[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3036-3047. DOI: 10.1074/jbc.M112.440370.
- [6] Wang J, Saraswat D, Sinha AK, et al. Paired related homeobox protein 1 regulates quiescence in human oligodendrocyte progenitors[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(12): 3435-3450. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.068.
- [7] 廖文尉, 章诚, 刘芙蓉, 等. Wnt/ β -catenin 信号调控 EMT 水平对小鼠胚胎干细胞向肝脏组织分化结构分化的影响[J]. 2018, 98 (30): 2441-2447. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.30.015.
- [8] Mu J, Hui T, Shao B, et al. Dickkopf-related protein 2 induces G0 / G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/ β -catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39443-39459. DOI: 10.18632/oncotarget.17055.
- [9] Bhuvanlakshmi G, Basappa, Rangappa KS, et al. Breast Cancer Stem-Like cells are inhibited by diosgenin, a steroidal saponin, by the attenuation of the wnt β -Catenin signaling via the wnt antagonist secreted frizzled related protein-4[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 124. DOI: 10.3389/fphar.2017.00124.
- [10] Wu Y, Tran T, Dwabe S, et al. A83-01 inhibits TGF- β -induced upregulation of Wnt3 and epithelial to mesenchymal transition in HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 163(3): 449-460. DOI: 10.1007/s10549-017-4211-y.
- [11] Tse CO, Kim S, Park J. Activation of Wnt signaling pathway by AF1q enriches stem-like population and enhance mammosphere formation of breast cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(4): 884-889. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.018.

(收稿日期:2019-07-10)

(本文编辑:陈新石)

·读者·作者·编者·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数

所具备的条件以及分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应尽量给出具体的 P 值(如 $P=0.023$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出 95% 可信区间。