

shRNA 靶向沉默 CNTN1 表达对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 裸鼠皮下移植瘤的抑制作用



贺赛¹, 耿洁², 杨晓民¹, 王虎霞¹, 韩丕华¹, 侯艳妮¹, 范拥国¹, 陈楠¹

1. 陕西省肿瘤医院乳腺肿瘤科 (西安 710061)

2. 西安交通大学第二附属医院心内科 (西安 710004)

【摘要】 目的 探讨 shRNA 靶向沉默接触蛋白-1 (CNTN1) 基因表达对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用。方法 18 只 4 周龄雄性 BALB/c 裸鼠随机均分为 3 组, 收集处于对数生长期的 MDA-MB-468 细胞 (空白对照组)、转染无义 shRNA 片段的 MDA-MB-468 细胞 (空载体组) 及转染 shRNA 载体片段的 MDA-MB-468 细胞 (沉默组) 分别于每组裸鼠后背部皮下注射制备裸鼠皮下移植瘤模型, 观察沉默 CNTN1 基因对 MDA-MB-468 细胞移植瘤生长的影响以及采用免疫组织化学方法检测移植瘤中 CNTN1 与 Ki-67 蛋白的表达情况。结果 各组裸鼠皮下接种肿瘤细胞后均成功致瘤, 成瘤率为 100%。每 3 d 测量种植瘤体积发现沉默组种植瘤生长速度显著低于空白对照组 ($P<0.05$) 和空载体组 ($P<0.05$), 至第 18 天处死裸鼠获取肿瘤, 发现沉默组种植瘤的体积及质量均显著小或低于空白对照组 ($P<0.05$) 和空载体组 ($P<0.05$); 沉默组种植瘤中 CNTN1 和 Ki-67 蛋白表达阳性率均明显低于空白对照组 ($P<0.05$) 和空载体组 ($P<0.05$)。结论 沉默 CNTN1 基因表达可以抑制人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 细胞裸鼠移植瘤的生长。

【关键词】 乳腺癌; MDA-MB-468 细胞; 裸鼠; 移植瘤; 接触蛋白-1; Ki-67 蛋白

Effects of short hairpin RNA-mediated CNTN1 gene silencing on growth of transplanted tumors in nude mice

HE Sai¹, GENG Jie², YANG Xiaomin¹, WANG Huxia¹, HAN Pihua¹, HOU Yanni¹, FAN Yongguo¹, CHEN Nan¹

1. Department of Breast Oncology, Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an 710061, P. R. China

2. Department of Cardiovascular Internal Medicine, The Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, P. R. China

Corresponding author: CHEN Nan, Email: 20795846@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of short hairpin RNA (shRNA) mediated contactin-1 (CNTN1) gene silencing on growth of human breast cancer cell line MDA-MB-468 transplanted tumors in nude mice. **Methods** Eighteen nude mice (4-week-old male BALB/c) were randomly equally divided into three groups: blank control group, empty vector group, and silencing group. The MDA-MB-468 cells (blank control group), MDA-MB-468 cells transfected by nonsense shRNA (empty vector group), and MDA-MB-468 cells transfected by shRNA (silencing group) were collected in the logarithmic growth period, respectively. The subcutaneous tumor models of nude mice were prepared by the subcutaneous injection of the different group cells. The tumor growth was observed and the expressions of CNTN1 and Ki-67 proteins in the transplanted tumor were detected by the immunohistochemistry. **Results** The xenograft models of human breast cancer cells were established successfully. The tumor growth in the silencing group was significantly slower than that of the other two groups at every 3 d point ($P<0.05$). The tumor volume and the tumor weight in the silencing group were significantly smaller or slighter than those of the other two groups at day 18 ($P<0.05$). The positive rates of CNTN1 and Ki-67 protein expressions in the tumor tissues of the silencing group were lower than those of the other two groups ($P<0.05$), respectively. **Conclusion** Silencing expression of CNTN1 gene might inhibit growth of breast cancer cell line MDA-MB-468 transplanted tumors in nude mice.

【Keywords】 breast cancer; MDA-MB-468 cell; nude mice; xenograft tumor; contactin-1; Ki-67 protein

乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤第1位^[1]。虽然以手术为主的综合治疗使乳腺癌的预后有了明显改善,但总体预后仍不理想^[2-3]。有研究发现接触蛋白-1(contactin-1, CNTN1)基因作为癌基因在包括前列腺癌、肺癌及胃癌在内的多种肿瘤中异常表达与其发生及发展有关^[4-7],然而其在乳腺癌中的功能研究却鲜有报道。本课题组通过前期研究^[8]发现沉默CNTN1基因表达可以显著降低乳腺癌细胞的增殖及克隆形成能力,为进一步探讨CNTN1基因在乳腺癌中的功能,本研究采用皮下注射乳腺癌细胞构建裸鼠人乳腺癌移植模型,进一步观察沉默CNTN1基因在体内环境中对乳腺癌移植瘤生长的影响,从而为乳腺癌的治疗发现新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM细胞培养基和胎牛血清购自美国Invitrogen公司,兔抗人CNTN1、Ki-67单克隆一抗购自美国Epitomics公司,羊抗兔二抗、SP兔HRP显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验动物与细胞株

4周龄雄性BALB/c裸鼠18只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,饲养于SPF条件下。人乳腺癌细胞株MDA-MB-468(空白对照组)、转染无义shRNA片段的MDA-MB-468细胞(空载体组)及转染shRNA载体片段的MDA-MB-468细胞(沉默组)均由本课题组前期构建并保存,置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中在37℃、5%CO₂培养箱中培养,取生长状态良好的细胞进行实验。

1.3 裸鼠移植瘤模型的建立

18只BALB/c裸鼠采用随机数字表法随机分为3组,DMEM细胞培养每组6只。收集处于对数生长期的各组(空白对照组、空载体组和沉默组)细胞,细胞密度均调整至 $5 \times 10^6/\text{mL}$,然后分别于裸鼠后背部皮下注射0.2 mL不同细胞,种植完成后,每天观察并记录肿块出现时间。肿瘤形成后继续观察,每3 d用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径后计算肿瘤体积(肿瘤体积= $\pi/6 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$)并绘制肿瘤生长曲线。于肿块长至直径1.5~2.0 cm大小时,断颈处死裸鼠,摘取移植瘤并称其质量,然后计算抑瘤率,其公式为:抑瘤率(%)=(空白对照组瘤平均质量-沉默组瘤平均质量)/空白对照组瘤平均质量 $\times 100\%$ 。

1.4 移植瘤组织中CNTN1和Ki-67蛋白表达检测

采用免疫组化法检测各组裸鼠移植瘤组织中CNTN1和Ki-67蛋白的表达。将各组裸鼠移植瘤

组织经4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片(4~6 μm 厚)。依次将载玻片放入二甲苯 \rightarrow 二甲苯 $\rightarrow 100\%$ 乙醇 $\rightarrow 100\%$ 乙醇 $\rightarrow 95\%$ 乙醇 $\rightarrow 90\%$ 乙醇 $\rightarrow 80\%$ 乙醇 $\rightarrow 70\%$ 乙醇,每种试剂中放10 min,清水冲洗,加入3% H₂O₂浸泡10 min,清水冲洗2次,后加入柠檬酸缓冲液,放入微波炉中蒸煮3 min(中火),冷却至室温,将柠檬酸缓冲液倒掉,清水冲洗2次,并将载玻片置于PBS中5 min,擦干组织周围的PBS,加血清,放入37℃温箱30 min,加一抗后于4℃冰箱中保存过夜。取出载玻片,放入PBS中冲洗3次,每次5 min,擦干组织周围的PBS后加入二抗,37℃温箱中30 min。后放入PBS中冲洗3次,每次5 min,擦干组织周围的PBS后加入显色剂。将显色后的片子用清水冲洗,浸泡于苏木精中染色1 min。依次将载玻片放入70%乙醇 $\rightarrow 80\%$ 乙醇 $\rightarrow 90\%$ 乙醇 $\rightarrow 95\%$ 乙醇 $\rightarrow 100\%$ 乙醇 $\rightarrow 100\%$ 乙醇 \rightarrow 二甲苯 \rightarrow 二甲苯,每种试剂中放置2 min,用中性树胶封片,以PBS代替一抗作阴性对照。胞质或胞核呈棕黄色染色为阳性,其中CNTN1蛋白阳性表达以胞质着色为主,Ki-67蛋白阳性表达以胞核染色为主,每张切片随机取5个视野($\times 400$),每个视野观察200个细胞,计算阳性细胞率。

1.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析。对符合正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较用单因素方差分析,两样本均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 沉默CNTN1基因表达对裸鼠皮下种植瘤生长的影响

裸鼠皮下分别接种各组细胞悬液后全部存活且于第6天有肿瘤形成,致瘤成功率100%。各组种植瘤持续生长,未出现致瘤裸鼠死亡。至第18天时,肿瘤生长至1.5~2.0 cm,拍照记录并处死裸鼠获取肿瘤(图1a)。绘制肿瘤生长曲线(图1b),可见沉默组种植瘤生长速度低于空白对照组($P<0.05$)与空载体组($P<0.05$),空白对照组与空载体组比较差异无统计学意义($P>0.05$);至第18天处死裸鼠时沉默组裸鼠皮下种植瘤的体积显著小于空白对照组($P<0.05$)与空载体组($P<0.05$),而空白对照组与空载体组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。处死裸鼠时获取的各组肿瘤质量见图1c,种植瘤质量沉默组明显低于空白对照组($P<0.05$)及空载体组($P<0.05$),而空白对照组与空载体组比较差异无

统计学意义 ($P>0.05$)。沉默组的抑瘤率为 51.72%。

2.2 各组种植瘤中 CNTN1 和 Ki-67 蛋白表达结果

结果见图 1d-1g。CNTN1 蛋白在肿瘤细胞中呈阳性棕黄色染色表达于细胞质(图 1d)；Ki-67 蛋白在肿瘤细胞中呈阳性棕黄色染色表达于细胞核(图 1f)。肿瘤细胞中 CNTN1 蛋白表达阳性率在沉默组低于空白对照组 ($P<0.05$) 及空载体组 ($P<0.05$)，而空白对照组与空载体组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 1e；Ki-67 蛋白表达阳性率在沉默组明显低于空白对照组 ($P<0.05$) 及空载体组 ($P<0.05$)，而空白对照组与空载体组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 1g。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤^[9]，预后欠佳并有年轻化趋势^[10]。随着新的药物研发、手术方式的改进和多种治疗方法的介入，乳腺癌患者生存期显著提高，但综合治疗副作用较大，患者对治疗效

果仍有较高预期^[11-12]。近年来，随着遗传学和肿瘤分子生物学的深入，肿瘤的基因治疗作为一种新的治疗手段逐步应用于临床^[13]，人们期待基因治疗在乳腺癌领域也能够发挥作用，但目前仍未能找到有效的乳腺癌治疗靶点^[14]。

恶性肿瘤的发生及发展与基因的正常表达密切相关^[15]。随着对肿瘤相关基因研究的深入，CNTN1 作为一种神经接触分子渐渐开始被研究者关注^[16]，其参与介导了神经系统的生长发育和多种神经细胞的功能^[17]，它的异常表达与肿瘤的发生发展、迁移侵袭、转移甚至预后关系密切^[18-20]。Su 等^[21]通过基因芯片技术，首次发现 CNTN1 基因是影响肺癌细胞侵袭能力的重要基因之一。Wu 等^[22]发现 CNTN1 的表达与口腔鳞状细胞癌的淋巴道转移相关。Liu 等^[23]在了一项研究 CNTN1 与食管鳞状细胞癌关系的实验中发现，CNTN1 基因和其受体促进了肿瘤的血管和淋巴管生成，并且发现 VEGF-C 是通过调控 CNTN1 的表达，从而促进食管鳞状细胞

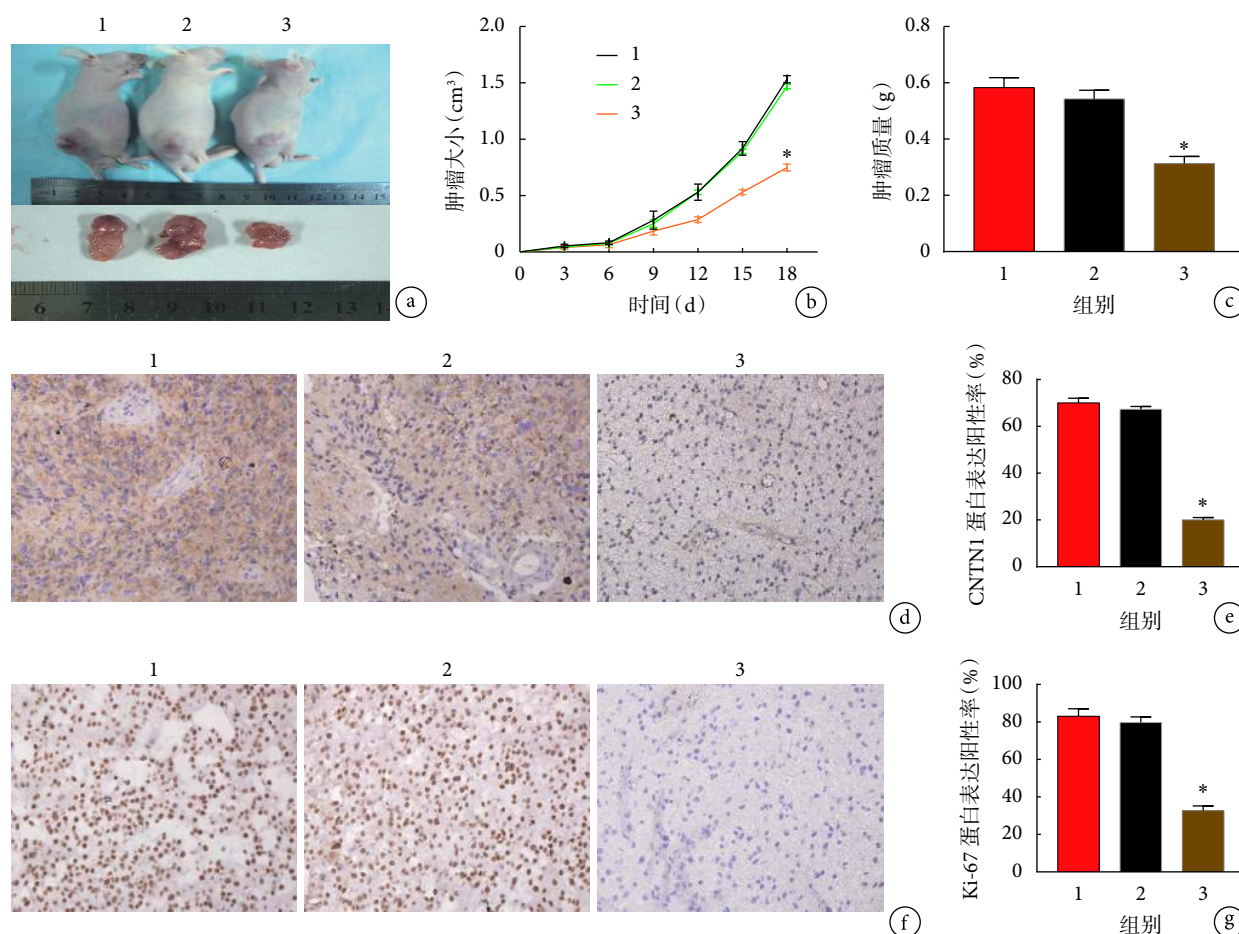


图 1 示各组裸鼠皮下种植瘤生长情况及 CNTN1 和 Ki-67 蛋白表达检测结果

a: 各组移植瘤生长至第 18 天时的肿瘤情况及取出的肿瘤；b: 各组裸鼠移植瘤生长曲线；c: 各组裸鼠移植瘤质量；d、e: 分别为各组种植瘤中 CNTN1 蛋白表达的定性 (SP ×200) 及半定量结果；f、g: 分别为各组种植瘤中 Ki-67 蛋白表达的定性 (SP ×200) 及半定量结果。1: 空白对照组；2: 空载体组；3: 沉默组。与空白对照组和空载体组比较，* $P<0.05$

癌细胞系的侵袭能力。亦有研究^[24]显示, CNTN1在胃癌原发灶中异常表达,可能是胃癌新生淋巴管生成的分子基础,影响胃癌淋巴道的转移,对胃癌的诊断、治疗及预后有一定的指导价值。目前针对CNTN1在乳腺肿瘤中的研究相对较少^[25],在乳腺癌中的功能仍尚不明确,因此,本课题组拟通过系列研究阐明CNTN1在乳腺癌中的功能并进一步明确其影响乳腺癌发生及发展的可能机制。

在前期工作中,本课题组已成功获得沉默CNTN1基因表达的人乳腺癌细胞株MDA-MB-468,发现沉默乳腺癌细胞系中CNTN1的表达可抑制乳腺癌细胞系的增殖、克隆形成以及迁移侵袭能力。为进一步明确CNTN1在乳腺癌中的作用,本实验拟在体内实验通过沉默乳腺癌细胞中CNTN1的表达,研究其与裸鼠皮下移植瘤生长的关系。结果显示,沉默组肿瘤生长速度、体积及质量均显著慢或小或轻于空白对照组,提示沉默CNTN1的表达能抑制MDA-MB-468移植瘤的生长。此外,通过免疫组化法检测移植瘤中CNTN1和Ki-67的表达情况,结果显示,沉默组种植瘤中CNTN1蛋白表达阳性率明显低于空白对照组,这是CNTN1基因被沉默表达的结果;同时该组中增殖细胞核抗原Ki-67的蛋白表达阳性率明显低于空白对照组,基于Ki-67体现的是肿瘤增殖活性,这与沉默组肿瘤生长被抑制结果相符。

本实验结果初步证明沉默CNTN1表达可有效抑制裸鼠皮下乳腺癌移植瘤的生长,提示CNTN1在乳腺癌的发病中可能起重要作用,为后续研究CNTN1基因在乳腺癌中的作用奠定了基础,同时为乳腺癌的治疗发现新靶点提供初步的理论依据。

重要声明

利益冲突声明:本文全体作者阅读并理解了《中国普外基础与临床杂志》的政策声明,我们无相互竞争的利益。

作者贡献声明:贺赛参与实验设计及部分实验研究;陈楠参与分析、解释数据及统计分析;耿洁、杨晓民、王虎霞、韩丕华参与部分实验研究及采集数据;侯艳妮、范拥国参与对文章的知识性内容作批评性审阅及起草文章。

伦理声明:本研究已通过陕西省肿瘤医院伦理委员会的审核批准。

参考文献

- Hooper RC, Hsu J, Duncan A, *et al.* Breast cancer knowledge and decisions made for contralateral prophylactic mastectomy: a survey of surgeons and women in the General population. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(5): 936e-945e.
- Lee J. A meta-analysis of the association between physical activity and breast cancer mortality. *Cancer Nurs*, 2019, 42(4): 271-285.

- 李宗熹, 种妹伊, 古丽米然·阿里同别克, 等. 舒林酸衍生物 K-80003 与 MEK 抑制剂考比替尼联合用药对乳腺癌的效果研究. *中国药理学通报*, 2019, 35(2): 251-254.
- Haenisch C, Diekmann H, Klinger M, *et al.* The neuronal growth and regeneration associated Cntn1(F3/F11/Contactin) gene is duplicated in fish: expression during development and retinal axon regeneration. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(2): 361-374.
- Yan J, Ojo D, Kapoor A, *et al.* Neural cell adhesion protein CNTN1 promotes the metastatic progression of prostate cancer. *Cancer Research*, 2016, 76(6): 1603-14.
- Chen DH, Wei J, Jiang BJ. Contactin 1: A potential therapeutic target and biomarker in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2015, 33: 9707-9716.
- Xu S, Lam S, Cheng P, *et al.* Contactin 1 modulates pegylated arginase resistance in small cell lung cancer through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 2031-2044.
- Chen N, He S, Ding YN, *et al.* Effects of recombinant plasmid of pEGFP-N1-CNTN1 on proliferation, clone formation, migration and invasion of Hs578T cells. *Modern Oncol*, 2016, 24(19): 3017-3020.
- Span PN, Sweep FC, Wigerinck ET, *et al.* Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem*, 2004, 50(11): 1986-1993.
- Stone JK, Kim JH, Vukadin L, *et al.* Hypoxia induces cancer cell-specific chromatin interactions and increases MALAT1 expression in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2019, 294(29): 11213-11224.
- Révillion F, Hornez L, Peyrat JP. Quantification of c-erbB-2 gene expression in breast cancer by competitive RT-PCR. *Clin Chem*, 1997, 43(11): 2114-2120.
- Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, *et al.* Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem*, 2014, 60(1): 214-221.
- 任云晓, 肖茹丹, 姜晓敏, 等. 基因编辑技术及其在基因治疗中的应用. *遗传*, 2019, 41(1): 18-27.
- Lei JT, Shao J, Zhang J, *et al.* Abstract PD8-03: ESR1 gene fusions drive endocrine therapy resistance and metastasis in breast cancer. *Cancer Res*, 2018, 78(4 Supplement): PD8-03-PD8-03.
- Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, *et al.* Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem*, 2001, 47(10): 1901-1911.
- Illa I. ARTHUR ASBURY LECTURE: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: clinical aspects and new animal models of auto-immunity to nodal components. *J Peripher Nerv Syst*, 2017, 22(4): 418-424.
- Poot M. Intragenic CNTNAP2 deletions: A bridge too far. *Mol Syndromol*, 2017, 8(3): 118-130.
- Anderson C, Gerding WM, Fraenz C, *et al.* PLP1 and CNTN1 gene variation modulates the microstructure of human white matter in the corpus callosum. *Brain Struct Funct*, 2018, 223(8): 3875-3887.
- Berglund EO, Ranscht B. Molecular cloning and *in situ* localization of the human contactin gene (CNTN1) on chromosome 12q11-q12. *Genomics*, 1994, 21(3): 571-582.
- 陈德虎, 俞继卫, 姜波健. 接触蛋白-1 在实体肿瘤中的作用. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(30): 4785-4791.
- Su JL, Yang PC, Shih JY, *et al.* The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 209-223.
- Wu HM, Cao W, Ye DX, *et al.* Contactin 1(CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 265-270.
- Liu PF, Chen S, Wu WT, *et al.* Contactin-1(CNTN-1) overexpression is correlated with advanced clinical stage and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(7): 612-618.
- Yu JW, Wu SH, Lu RQ, *et al.* Expression and significances of contactin-1 in human gastric cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 2013: 210205.
- Benson JR, Jatoti I. The global breast cancer burden. *Future Oncol*, 2012, 8(6): 697-702.

收稿日期: 2020-02-16 修回日期: 2020-04-28

本文编辑: 李缨来/蒲素清