

论著·基础研究

抑制胞浆型磷脂酶 A2 γ 的表达对乳腺癌细胞迁移侵袭作用的研究

米力坎木·哈司木¹, 努尔比亚·玉苏甫¹, 田刚^{2△}

(1. 新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院药学部,新疆喀什 844000;

2. 天津市公安医院检验科,天津 300040)

摘要:目的 探讨胞浆型磷脂酶 A2 γ (cPLA2 γ)的表达在乳腺癌细胞迁移和侵袭能力变化中的潜在作用。**方法** (1)采用免疫组织化学的方法检测 cPLA2 γ 在乳腺癌组织中的表达。(2)应用 StealthTM-RNAi 技术,瞬时转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞而抑制 cPLA2 γ 的表达,分别采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blotting 技术检测 cPLA2 γ 的信使 RNA(mRNA)和蛋白的表达水平;通过划痕实验观察细胞迁移能力的变化;观察抑制 cPLA2 γ 表达的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力变化。(3)应用 Western blot 技术检测抑制 cPLA2 γ 表达后,MDA-MB-231 细胞在 EGF 刺激不同时间后 Akt(Ser473 和 Thr308)、cofilin 和 PKC ζ 磷酸化水平变化。(4)稳定转染 MDA-MB-231 细胞而获得抑制 cPLA2 γ 表达的克隆细胞。采用鼠尾静脉注射的方式将抑制 cPLA2 γ 表达的稳定克隆 MDA-MB-231 细胞注入免疫缺陷的 SCID 小鼠体内,观察在不同的时间肿瘤细胞的被动转移情况。**结果** (1) cPLA2 γ 在乳腺癌组织中表达与淋巴结转移相关。(2)瞬时转染 MDA-MB-231 细胞,和对照组相比 cPLA2 γ 的 mRNA 和蛋白表达水平降低;迁移能力降低;同时 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力降低。(3)与对照组相比,抑制 cPLA2 γ 表达后的 MDA-MB-231 细胞 Akt(Ser473 和 Thr308)、cofilin 和 PKC ζ 磷酸化表达水平均降低。(4)稳定转染 MDA-MB-231 细胞而获得抑制 cPLA2 γ 表达的克隆,与对照组相比 mRNA 和蛋白表达水平明显降低;抑制 cPLA2 γ 表达的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞注入 SCID 小鼠的尾静脉,乳腺肿瘤细胞被动转移能力降低。**结论** cPLA2 γ 参与 EGF 诱导的乳腺癌细胞的迁移和侵袭,其调控与 Akt 通路有关。

关键词:MDA-MB-231 细胞; 胞浆型磷脂酶 A2 γ ; 抑制; 迁移; 侵袭**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.005**中图法分类号:**R737.9**文章编号:**1673-4130(2019)09-1041-04**文献标识码:**A

Study on the effects of the inhibition of the expression of cPLA2 γ on breast cancer cell migration and invasion

MILIKANMU Hasimu¹, NUERBIYA Yusufu¹, TIAN Gang^{2△}

(1. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kasha Area, Kasha,

Xinjiang 844000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Gong'an Hospital, Tianjin 300040, China)

Abstract: Objective To investigate the role of cytoplasmic phospholipase A2 γ (cPLA2 γ) in breast cancer cell migration and invasion. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of cPLA2 γ in breast cancer. StealthTM RNAi technique was used to transfect breast cancer MDA-MB-231 cells instantaneously and inhibit the expression of cPLA2 γ . The expression of cPLA2 γ was detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. The change of cell migration ability was observed by scratch test. The invasive ability of MDA-MB-231 cells inhibiting the expression of cPLA2 γ was observed. The phosphorylation levels of Akt (Ser473 and Thr308), cofilin and PKC in MDA-MB-231 cells stimulated by EGF at different time after inhibition of the expression of cPLA2 γ were detected by Western blotting technique. MDA-MB-231 cells were stably transfected and cloned to inhibit the expression of cPLA2 γ . Stable cloned MDA-MB-231 cells inhibiting the expression of cPLA2 γ were injected into immunodeficient SCID mice by tail vein injection to observe the passive metastasis of tumor cells at different time. **Results**

The expression of cPLA2 γ in breast cancer was associated with lymph node metastasis. Compared with the control group, the mRNA and protein expression of cPLA2 γ in MDA-MB-231 cells transfected instantaneously decreased, the migration ability decreased, and the invasion ability of MDA-MB-231 cells decreased. Compared with the control group, the phosphorylation levels of Akt (Ser473 and Thr308), cofilin and PKC in MDA-MB-231 cells decreased after inhibition of cPLA2 γ expression. MDA-MB-231 cells were stably transfected and

作者简介:米力坎木·哈司木,女,维族,大学本科,主管药师,主要从事医院药学方面的研究。**△ 通信作者:**E-mail:tiangang@126.com.**本文引用格式:**米力坎木·哈司木,努尔比亚·玉苏甫,田刚.抑制胞浆型磷脂酶 A2 γ 的表达对乳腺癌细胞迁移侵袭作用的研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1041-1044.

cloned to inhibit the expression of cPLA γ . Compared with the control group, the mRNA and protein expression of cPLA γ was significantly decreased. Breast cancer MDA-MB-231 cells with the expression inhibition of cPLA γ was injected into tail vein of SCID mice, and the passive metastasis ability of breast cancer cells was reduced. **Conclusion** CPLA γ is involved in EGF-induced migration and invasion of breast cancer cells, and its regulation is related to Akt pathway.

Key words: MDA-MB-231 cells; cytosolic phospholipase A2 γ ; invasion; migration; metastasis

胞浆型磷脂酶 A2(CPLA2)家族包含 6 个胞内酶,其中胞浆型磷脂酶 A2 γ (cPLA2 γ)是 cPLA2 家族具有独特结构的成员^[1-2]。有报道 cPLA2 家族的其他成员与结肠、小肠和肺部肿瘤的发生有密切的联系,特别近年来研究发现 cPLA2 α 在乳腺癌侵袭转移中有一定作用^[3-5],但 cPLA2 γ 与肿瘤的关系只处于理论推断上,国内外未见详细的报道。本研究试图从 cPLA2 γ 角度探索乳腺癌侵袭转移的信号传导通路及其对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响,为遏制此类疾病的发生提供一些有价值的帮助。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 组织标本和细胞系 乳腺癌患者组来自新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院(以下简称“本院”)2015 年 1 月至 2017 年 2 月手术切除的 139 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。139 例乳腺癌患者的病历资料经住院部病案室查阅,结合随访资料完善基本资料分析。其中乳腺癌患者年龄分布范围为 30~65 岁,平均(48.8±4.1)岁。入选标准符合世界卫生组织(WHO)的乳腺癌诊断标准。乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株由本院研究所实验中心提供。

1.1.2 试剂与仪器 cPLA2 γ (圣克鲁斯生物技术公司);cofilin 和 p-cofilin(细胞信号转导生物技术公司);p-Akt 和 p-PKC ζ (艾博抗生物技术公司);Akt 和 PKC ζ (圣克鲁斯生物技术公司);Stealth™ RNA 转染试剂盒(大连宝生物);cPLA2 γ 免疫组化试剂盒(北京中杉生物公司);兔抗人 β -actin 多克隆抗体(英杰生命技术有限公司)。超净工作台(细胞培养专用,中国安泰生物技术公司);Olympus IX70 倒置显微镜(日本奥林巴斯);转膜仪(伯乐生物医学有限公司);凝胶成像系统(美国柯达公司);Transwell 小室(美国密理博公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 常规培养,待细胞进入对数生长期后,用 PBS 清洗两次,0.25% 胰酶消化,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续试验。

1.2.2 抑制 cPLA2 γ 的表达及其检测 设计 3 段 cPLA2 γ 靶 Stealth siRNA 序列(si#1, si#2 and si#3 siRNA)转染 MDA-MB-231 细胞,同时用一段无关

序列转染 MDA-MB-231 细胞作为转染对照组(scr 表示),未进行转染的细胞作为对照组。48~72 h 后裂解细胞,用 Western blot 检测 cPLA2 γ 的表达情况。用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mRNA 水平。

1.2.3 Stealth™-RNA 转染 采用脂质体复合物滴加细胞表面的方法转染,6 h 后换成常用 RPMI-1640 培养液;细胞转染 72 h 后,取细胞进行下一次转染,细胞经转染两次后进行下一步实验。

1.2.4 免疫组化检测 cPLA2 γ 表达 应用免疫组化检测临床乳腺癌标本石蜡切片中 cPLA2 γ 蛋白的表达情况。按照操作说明书进行,染色结果由两名中级职称以上病理科医生采用双盲原则评定。结果判定胞浆出现浅黄至棕黄色颗粒为阳性。

1.2.5 划痕实验 6 孔培养板每孔接种 5×10^5 个细胞孵育过夜,然后用无菌移液枪头在培养皿表面划匀直线一道。观察划线周边细胞移动距离,分别测量 3 处取均值绘制曲线。

1.2.6 Western blot 检测 cofilin、PKC ζ 及其磷酸化抗体和 Akt 及其磷酸化抗体的表达 细胞培养进入对数生长期,向 6 孔板中加入细胞裂解液(300 μ L/孔,其中 PMSF 浓度为 0.1%),冰上裂解后用 10% SDS-PAGE 胶进行电泳,分别用 cofilin、p-cofilin、PKC ζ 、p-PKC ζ 、Akt 和 p-Akt(ser473 和 Thr308)的兔抗人单克隆一抗(1:1 000)室温下孵育 2 h,再用过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)室温下孵育 30 min。

1.2.7 稳定转染 MDA-MB-231 细胞挑选抑制 cPLA2 γ 表达的克隆细胞 稳定转染 MDA-MB-231 细胞,欲获得抑制 cPLA2 γ 表达的 MDA-MB-231 稳定克隆细胞(用 shcPLA2 γ MDA-MB-231 细胞表示),Western blot 检测挑选的稳定克隆细胞抑制 cPLA2 γ 表达的效果。shcPLA2 γ MDA-MB-231 细胞的 cPLA2 γ 蛋白表达比 scr MDA-MB-231 细胞的明显降低。

1.2.8 体内侵袭实验 实验动物采用免疫缺陷 SCID 小鼠,均来自中科院动物中心,4~6 周龄,雌性,清洁级;选取经过筛选的 scr 细胞和稳定转染有 cPLA2 γ shRNA 的 MDA-MB-231 细胞,调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL,悬液 20 μ L 以微量注射器注射于小鼠尾静脉(各 10 只,分别作为对照组和实验组)。注入小鼠肿瘤细胞后 2 周观察自发转移和定向转移情况,处死小鼠,取出小鼠的肺,观察脏器表面肿瘤结节

数和大小。

1.3 统计学处理 检测结果用 SPSS10.0 软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数比较采用方差分析,多重比较后两两比较采用 LSD-t 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化检测 cPLA 2γ 在乳腺癌组织中表达 139 例乳腺疾病患者中淋巴结转移的 89 例,淋巴结未转移的 50 例。在 89 例淋巴结转移病例中,有 80 例 cPLA 2γ 表达阳性。然而,在无淋巴结转移的 50 例病例中,只有 4 例 cPLA 2γ 表达阳性。两组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。配对的正常乳腺组织中无 cPLA 2γ 表达(图 1)。提示 cPLA 2γ 的表达与乳腺癌转移具有相关性。本研究未发现 cPLA 2γ 的表达与肿瘤大小和组织学分级有关。

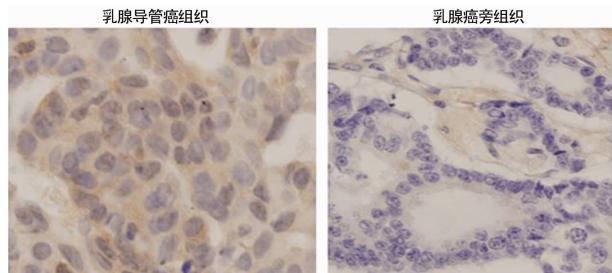


图 1 cPLA 2γ 在乳腺导管癌组织和乳腺癌旁组织中的表达(40 \times)

2.2 StealthTM-RNAi 技术分析 MDA-MB-231 细胞中 cPLA 2γ 表达情况

2.2.1 抑制 cPLA 2γ 表达的 MDA-MB-231 细胞 mRNA 和蛋白表达水平 转染 si#1、si#2 和 si#3 siRNA 的 MDA-MB-231 细胞 cPLA 2γ 的蛋白表达水平明显比对照组和 scr 细胞的 cPLA 2γ 蛋白表达水平降低,且 si#3 siRNA 的效果最明显。RT-PCR 结果也同样显示 MDA-MB-231 细胞的 cPLA 2γ 的 mRNA 表达水平明显比对照组降低。

2.2.2 抑制 cPLA 2γ 表达的 MDA-MB-231 细胞迁移能力影响 应用小 RNA 干扰技术瞬时转染 MDA-MB-231 细胞,抑制了 cPLA 2γ 的表达,细胞迁移和定向运动能力明显比对照组降低(图 2)。

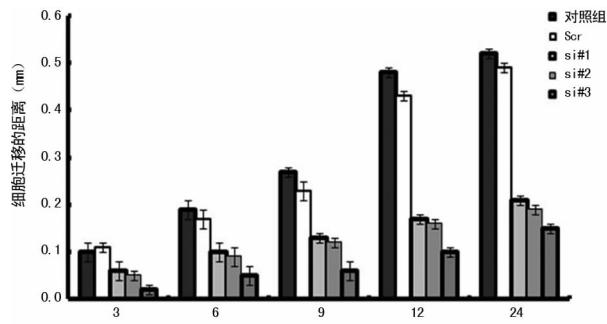


图 2 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞抑制 cPLA 2γ 的表达抑制细胞迁移

2.2.3 抑制 cPLA 2γ 表达对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 流式细胞术分析表明对照组 MDA-MB-231 细胞 G₀/G₁ 期为 45.3% \pm 3.1%, S 期为 34.9% \pm 2.9%, G₂/M 期为 20.8% \pm 1.8%。抑制 cPLA 2γ 表达的 MDA-MB-231 细胞 G₀/G₁ 期为 39.0% \pm 3.0%, S 期为 35.9% \pm 5.7%, G₂/M 期为 25.1% \pm 3.4%。结果显示抑制 cPLA 2γ 表达的 MDA-MB-231 细胞 S 期以及 G₂/M 期生长没有受影响,差异无统计学意义($P > 0.05$),进一步说明细胞迁移功能的改变不依赖于细胞增殖。

2.3 cPLA 2γ 抑制后细胞侵袭能力变化 计数聚碳酸酯膜中央部分和周围部分 5 个随机视野(200 \times)内侵袭细胞的数目,经过统计发现 Scr 细胞和通过 siRNA 抑制 PLA 2γ (sicPLA 2γ)/MDA-MB-231 细胞平均每个视野侵袭细胞为 243.15 个和 50.12 个, sicPLA 2γ /MDA-MB-231 细胞穿透 matrigel 胶的能力明显低于 Scr 组,与 Scr 组相比侵袭能力下降了 79.4%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

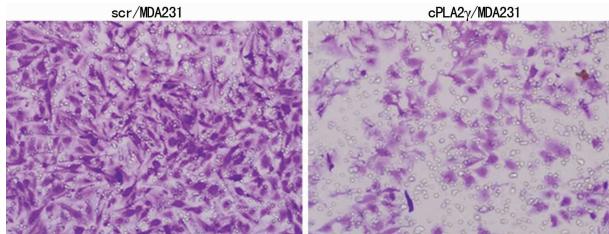


图 3 抑制 cPLA 2γ 表达的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

2.4 cPLA 2γ 调节 EGF 诱导的细胞信号分子 Akt、cofilin 和 PKC 磷酸化活性 在 sicPLA 2γ MDA-MB-231 细胞内,EGF 刺激 5 min 内,cofilin 的磷酸化表达水平与对照组相比有明显下降的趋势。Akt 在 cofilin 的信号通路上游,同时检测了 EGF 诱导的 Akt 473 和 308 位点的磷酸化水平,结果 sicPLA 2γ MDA-MB-231 细胞内 Akt 473 和 308 位点的磷酸化蛋白表达水平比对照组明显降低。另外 Akt 也是 PKC 的上游调节分子,sicPLA 2γ MDA-MB-231 细胞 PKC 磷酸化活性明显比对照细胞低。提示抑制 cPLA 2γ 表达对细胞迁移降低作用机制,与 PI3K/Akt 通路有关。

2.5 抑制 cPLA 2γ 表达对 SCID 鼠体内乳腺癌细胞肺转移的影响 尾静脉注入 shcPLA 2γ MDA-MB-231 细胞的 SCID 小鼠肺表面的肿瘤结节数明显比对照组注入 scr MDA-MB-231 细胞的少。两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨 论

作为近年来发现的 cPLA2 家族成员之一 cPLA 2γ 具有独特的结构已引起学术界广泛的关注。它是唯一钙离子非依赖型的膜结合磷脂酶 A,有两个保守的模序即 C 端的异戊烯化和 N 端的十四烷酰化^[5-8]。CAAX 的法尼基模序的突变将引起其在胞浆内定位的改变。另外 cPLA 2γ 缺乏 PLA1 的活性,从

sn-1 和 sn-2 位脱酰基作用释放油酸、花生四烯酸和其他不饱和脂肪酸。其活性功能的潜在上游信号分子研究的还不十分清楚^[9]。但本研究的结果充分体现 cPLA2 γ 在 EGF 诱导的乳腺癌侵袭转移中扮演着重要的角色。

应用免疫组化的方法发现, cPLA2 γ 在乳腺癌组织浸润性导管癌中有淋巴结转移的比无淋巴结转移的表达率高。经统计学分析 cPLA2 γ 的表达与临床病理参数的关系可见, cPLA2 γ 的表达升高与淋巴结转移相关。在不同的乳腺癌细胞系中 cPLA2 γ 的表达(不同于 cPLA2 其他亚型)是均匀的^[10-12]。抑制 cPLA2 γ 表达的乳腺癌细胞不能改变其生长周期, 这些与 cPLA2 γ 功能的独特性有关^[13]。所有的研究数据表明 cPLA2 γ 在肿瘤的发生和转移中起非常重要的作用。侵袭和转移是肿瘤发生发展的重要环节, 抑制癌基因及其受体的表达将是切断肿瘤蔓延生长的根本。本研究发现肿瘤发生的新靶点 cPLA2 γ 将为临床小分子抑制癌细胞生长提供新思路。

以前的文献曾报道 PKC ζ 在乳腺癌迁移中起着非常关键的作用^[14]。PKC ζ 的活化通过 PDK1/Akt2/Rictor 调节^[15]。本研究发现 cPLA2 γ 调节乳腺癌细胞的迁移是通过 PI3K/Akt 通路。EGF 诱导的 Akt473、Akt308 和 cofilin 的磷酸化水平在抑制 cPLA2 γ 表达后受到抑制也表明, cPLA2 γ 可能参与 PI3K/Akt 通路下游分子的定位和活化。cPLA2 γ 也可作为抑制肿瘤信号传导集簇应答的新靶点。

对 SCID 鼠体内乳腺癌细胞肺转移的影响观察可见, 鼠尾静脉注射抑制 cPLA2 γ 表达的乳腺癌细胞, SCID 小鼠肺表面的肿瘤结节数明显比对照组小鼠少。说明抑制 cPLA2 γ 表达影响了乳腺癌细胞的被动转移和定向转移。临幊上抑制肿瘤细胞的目的是延长患者生存期, 动物模型实验更进一步阐明 cPLA2 γ 表达与乳腺癌细胞生长及侵袭转移有关, 预示其可作为患者生存期延长的关键因子。

4 结 论

cPLA2 γ 参与 EGF 诱导的乳腺癌细胞的迁移和侵袭。抑制 cPLA2 γ 表达对乳腺癌细胞迁移起着抑制作用。本研究为进一步阐明乳腺癌侵袭转移机制提供新思路, cPLA2 γ 的调控与 Akt 通路有关。Akt 信号通路中的靶分子 cPLA2 γ 可能成为肿瘤基因治疗的新靶点。

参考文献

- [1] 张兵, 吴乔. 磷脂酶 C- γ 功能研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 93-97.
- [2] 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): 439-442.
- [3] 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): 506-512.

- [4] RIDLEY A J, SCHWARTZ M A, BURRIDGE K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back[J]. Science, 2003, 302(5651): 1704-1709.
- [5] 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): 16057-16071.
- [6] BLAINE S A, WICK M, DESSEV C, et al. Induction of cPLA(2) in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-jun[J]. J Biol Chem, 2001, 276(46): 42737-42743.
- [7] DEFILIPPIS R A, GOODWIN E C, WU L, et al. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cell[J]. Virology, 2003, 77(2): 1551-1563.
- [8] 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): 68-70.
- [9] 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): 2355-2357, 2358.
- [10] DESGROSELLIER J S, CHERESH D A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(1): 9-22.
- [11] 王晓华, 张玉娟, 周晓慧, 等. 针向干扰 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): 368-370.
- [12] FAN R S, JACAMO R O, JIANG X H, et al. G protein-coupled receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843-mediation by Ca²⁺, calmodulin, and Ca²⁺ calmodulin-dependent kinase II[J]. J Biol Chem, 2005, 280(25): 24212-24220.
- [13] JEONG W C, KIM K J, JU H W, et al. Cytoplasmic phospholipase a(2) metabolites play a critical role in pulmonary tumor metastasis in mice[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3421-3427.
- [14] 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): 818-822.
- [15] ZHONG X, LI X, LIU F, et al. Omentin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF- κ B pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(2): 401-406.

(收稿日期:2018-09-18 修回日期:2018-11-06)