

Stathmin 表达水平与乳腺癌细胞侵袭能力相关性研究*

杨 铭, 林 芳, 和 婷, 王 琳, 董 轲, 张惠中

(第四军医大学唐都医院临床实验与检验科, 西安 710038)

摘要:目的 探讨乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 中 Stathmin 基因表达水平与细胞生长、黏附、侵袭等生物学行为之间的关系, 为进一步研究乳腺癌转移机制奠定实验基础。方法 应用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中 Stathmin 基因的表达水平, 同时利用细胞增殖试验、细胞黏附试验和细胞侵袭试验检测 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的生长、黏附、侵袭能力, 分析 Stathmin 表达与细胞的生长、黏附、侵袭能力之间的关系。结果 RT-PCR 和 Western Blot 检测结果显示, Stathmin 基因在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中表达均高于正常对照细胞 ($F=10.173, P<0.05$), 且 MDA-MB-231 细胞中的表达水平明显高于 MCF-7 细胞中的表达水平 ($t=4.562, P<0.05$)。而 MDA-MB-231 细胞在生长、黏附和侵袭能力方面均强于 MCF-7 细胞 ($P<0.05$)。结论 Stathmin 表达水平高的乳腺癌细胞相应的生长、黏附、侵袭能力较强, Stathmin 表达水平与细胞侵袭能力密切相关。

关键词: Stathmin; 乳腺癌; 侵袭性

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.004

Correlation of Breast Cancer Cells Invasive and Stathmin Gene Expression

YANG Ming, LIN Fang, HE Ting, WANG Lin, DONG Ke, ZHANG Hui-zhong

(Department of Clinical Laboratory,

Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the Stathmin gene expression in breast cancer cells MDA-MB-231, MCF-7 and the biological behaviours such as cell growth, adhesion and invasion, and provide experimental basis of breast cancer metastasis for further study. Methods Used RT-PCR and Western Blot methods to detect the Stathmin gene expression levels in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, and in the mean while to test the MDA-MB-231 and MCF-7 cell growth, adhesion, invasion ability by CCK-8 cell proliferation experiments, cell adhesion experiments, cell invasion experiments, then, analysed the relationship of Stathmin gene expression and cell growth, adhesion, invasion ability. Results Over-expression levels of Stathmin gene were observed both in the MDA-MB-231 and MCF-7 cells ($F=10.173, P<0.05$), and furthermore, the expression levels of Stathmin gene in MDA-MB-231 cells was higher than in MCF-7 cells ($t=4.562, P<0.05$). While, the growth, adhesion and invasion ability of the MDA-MB-231 cells was higher than that of MCF-7 cells ($P<0.05$). Conclusion The higher level of Stathmin gene expression, the stronger breast cancer cells had ability of growth, invasion, and adhesive. The Stathmin gene expression levels was closely correlated with breast cancer cell invasive.

Keywords: Stathmin; breast cancer; aggressive

全球肿瘤流行病学统计数据(GLOBOCAN)显示, 乳腺癌是中国女性最常见的恶性肿瘤。并且乳腺癌在中国的发病高峰出现在 45~55 岁, 相对于美国及西方国家的 64 岁, 更加年轻^[1]。更为严峻的是中国的乳腺癌发病率增长速度是全球的两倍多^[2]。微管不稳定蛋白 Stathmin 是一种在细胞质中广泛存在的磷酸化蛋白, 通过四个磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化, 调控细胞的微管形成和有丝分裂^[3]。在多种恶性肿瘤中均发现 Stathmin 表达增高, 并且与肿瘤的发生、发展、表型决定密切相关^[4~7]。但是 Stathmin 的表达量和乳腺癌转移的

相关性并不十分清楚, 本实验拟通过检测乳腺癌细胞中 Stathmin 基因表达水平, 明确其对乳腺癌细胞的生长、黏附及侵袭能力等转移相关生物学行为的影响, 从而为进一步研究 Stathmin 表达与乳腺癌转移的相关性奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 乳腺癌细胞 MDA-MB-231, MCF-7 和血管内皮细胞 ECV304 均为本实验室保存。培养于 10 g/dl 小牛血清的 DMEM 培养液, 于 CO₂ 培养箱中, 37℃, 相对湿度 95% 条件下培养。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81372836)。

作者简介: 杨 铭(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤生物治疗, E-mail: yangming745@163.com。

通讯作者: 张惠中(1961—), 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤分子诊断及治疗靶点应用研究, E-mail: huiz328@163.com。

1.2 试剂和仪器 用于细胞增殖试验的 CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;DMEM 培养液均购自 GIBCO 公司;纤维连接蛋白(FN)购自 R & D 公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;Transwell 小室培养板购自 Corning Corstart 公司;新生小牛血清购自浙江天杭生物有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术公司;ECL 显色剂购自晶彩生物有限公司;DL2000 DNA Marker, BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京鼎国生物技术有限公司;二氧化碳孵箱购自德国 HERAEUS 公司;凝胶成像系统分析仪购自以色列 DNR 有限公司;5424 型高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测乳腺癌细胞 Stathmin 基因表达水平:设计 Stathmin 和 β -actin 基因 PCR 扩增引物并由北京奥科鼎盛生物技术公司进行合成。Stathmin-F: 5'-CCGATGGCTTCTTCTGATA TCC-3', Stathmin-R: 5'-CCGTTAGTCAGCTT CAGTCTCG-3'; β -actin-F: 5'-AGCGAGCATCC CCAAAGTT-3', β -actin-R: 5'-GGGCACGAAG GCTCATCATT-3' 分别提取血管内皮细胞 ECV304, MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞总 RNA, 常规法逆转录为 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板, 分别扩增 Stathmin 和 β -actin 基因片段, 反应条件为: 94℃ 3 min, 变性 94℃ 40 s, 退火 53℃ 40 s, 延伸 72℃ 40 s, 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。分别将 Stathmin 和 β -actin 的扩增产物等量混合后进行电泳。以血管内皮细胞 ECV304 为正常对照细胞, 比较 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞 Stathmin 基因相对表达量。

1.3.2 Western Blot 检测 Stathmin 蛋白表达水平:分别用常规方法提取血管内皮细胞 ECV304, MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞总蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度后, 分别取 40 μ g 细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 分别切取 Stathmin 蛋白和 β -actin 大小相应的凝胶条带, 电转法将电泳产物转移至 NC 膜上。转好的 NC 膜用 5 g/dl 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别对应加入兔抗人 Stathmin 抗体及内参照 β -actin 单克隆抗体, 4℃ 过夜, TBST 室温洗膜 3 次, 再分别加入相应二抗, 室温轻摇 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min。ECL 显色剂 A 液和 B 液等体积混合后加在 NC 膜上约 1 min, 暗室中用胶片显影, 并用凝胶成像分析仪分析结果, 同时比较 Stathmin 蛋白相对表达水平。

1.3.3 CCK-8 细胞增殖试验:常规消化血管内皮

细胞 ECV304, MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞。离心收集后, 用含血清的培养基重悬细胞并进行细胞计数, 将细胞浓度调整至 2×10^4 个/ml。分别将细胞接种到 5 块 96 孔板中, 每孔接种 100 μ l 细胞悬液, 每个细胞接种 5 个复孔, 并设置一个空白对照孔, 将培养板置于 37℃, 5 ml/dl CO₂ 的培养箱中培养, 48 h 换液一次。每隔 24 h, 取出 1 个 96 孔板, 小心洗去培养液, 每孔中加入 100 μ l 含血清的 DMEM 培养液和 10 μ l CCK-8 溶液, 37℃ 孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度, 计算平均值及标准差。

1.3.4 细胞黏附试验:将 96 孔细胞培养板中每孔加入 0.02 g/L 的纤维连接蛋白(FN)50 μ l, 置于超净工作台风干过夜。使用前 PBS 漂洗两次, 每孔加入 1 g/dl BSA 200 μ l, 用于封闭非特异性结合位点, 37℃ 孵育 1 h。常规三种消化细胞, 用无血清培养液制备浓度为 1×10^5 个/ml 细胞悬液, 每孔加入 100 μ l 细胞悬液。每种细胞设实验组和对照组 5 个复孔, 37℃, 5 ml/dl CO₂ 孵育 1 h。用 PBS 洗两次去除实验组未黏附的细胞, 对照组不进行 PBS 处理。4ml/dl 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗两次, 用结晶紫溶液染色 25 min 后流水冲洗, 自然干燥后, 每孔加入 0.5 g/dl Triton X-100 200 μ l, 溶解染色液, 摇床过夜, 最后用分光光度计检测 590 nm 处吸光度 A 值, 细胞黏附量 = 实验组 A_{590nm} / 对照组 A_{590nm}。

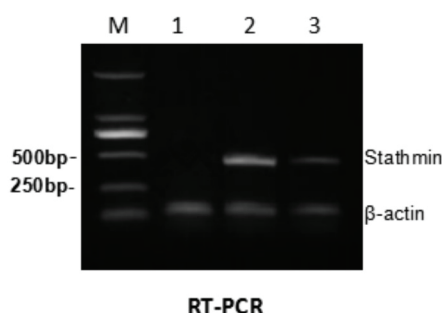
1.3.5 细胞侵袭试验:将 Matrigel 基质胶用不完全 DMEM 按 1:8 稀释后, 每个 Transwell 小室的上室中加入 100 μ l 进行包被, 室温放置 4 h。吸去多余液体, 加入含 1 g/dl BSA 的 DMEM 50 μ l 水化, 37℃ 30 min。常规消化三种细胞, 收集 2×10^5 个细胞, 并用 1 ml 含 0.2 g/dl BSA 的 DMEM 重悬细胞团制成细胞悬液, 每个上室中加入细胞悬液 100 μ l, 下室中加入 600 μ l 含 10 g/dl FBS 的 DMEM, 注意上下室没有气泡。37℃ 孵育 48 h, 弃培养液, 取出小室, 用 PBS 淋洗小室 3 次, 用棉签擦去小室内表面的基质胶和细胞, 95 ml/dl 乙醇固定 5 min, 加结晶紫染液染色 5 min, PBS 冲洗后, 在倒置显微镜下计数微孔膜下层的穿膜细胞数, 每个样品随机计数 10 个 100 倍放大视野。

1.4 统计学分析 利用统计软件 SPSS19.0 对实验数据进行分析。数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数间两两比较运用 *t* 检验, 多组间分析运用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

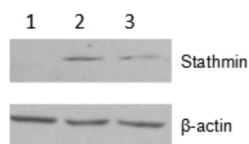
2.1 乳腺癌细胞中 Stathmin 表达水平检测 见

图1和图2。通过RT-PCR和Western Blotting方法分别从核酸和蛋白水平检测乳腺癌细胞系MDA-MB-231, MCF-7细胞和正常对照血管内皮细胞ECV304中Stathmin的表达水平, Stathmin基因相对表达量分别为 1.621 ± 0.154 , 0.539 ± 0.068 , 0.029 ± 0.007 。Stathmin蛋白相对表达量分别为 0.872 ± 0.106 , 0.348 ± 0.051 , 0.016 ± 0.003 。各细胞间差异有统计学意义($F=10.173$, $P<0.05$)。Stathmin基因在MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞中表达均高于正常对照细胞, MDA-MB-231细胞中Stathmin基因表达水平明显高于MCF-7细胞($t=4.562$, $P<0.05$)。



M: Marker; 1: 正常对照血管内皮细胞 ECV304; 2: MDA-MB-231 细胞; 3: MCF-7 细胞

图1 RT-PCR检测MCF-7, MDA-MB-231细胞中Stathmin的表达情况



Western Blotting

1: 正常对照血管内皮细胞 ECV304; 2: MDA-MB-231 细胞; 3: MCF-7 细胞

图2 Western Blotting检测MCF-7,

MDA-MB-231细胞中Stathmin的表达情况

2.2 CCK-8细胞增殖试验 见图3。用CCK-8细胞增殖试验检测正常对照血管内皮细胞ECV304, MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞增殖能力。MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞增殖能

力均高于正常对照血管内皮细胞ECV304, 差异具有统计学意义($t_{\text{MDA-MB-231}}=3.736$, $t_{\text{MCF-7}}=2.942$, $P<0.05$)。MDA-MB-231细胞比MCF-7细胞增殖能力更强。

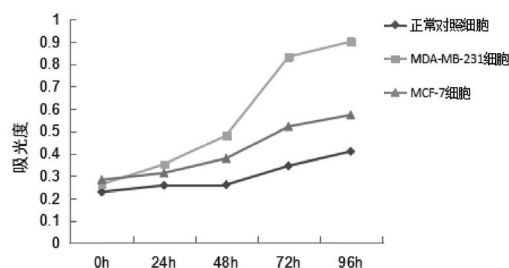


图3 MDA-MB-231和MCF-7细胞增殖试验结果

2.3 细胞黏附试验 见图4。正常对照血管内皮细胞ECV304黏附量为 0.233 ± 0.004 , MDA-MB-231细胞黏附量为 0.851 ± 0.042 , MCF-7细胞黏附量为 0.675 ± 0.039 。差异均具有统计学意义($F=4.692$, $P<0.05$)。两种乳腺癌细胞黏附量均高于正常对照血管内皮细胞ECV304, 且MDA-MB-231细胞黏附量明显高于MCF-7细胞。

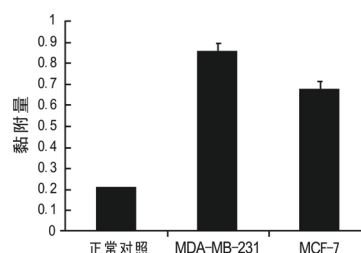


图4 乳腺癌MDA-MB-231, MCF-7细胞黏附量比较图

2.4 细胞侵袭试验 见图5和图6。用Transwell小室培养法对血管内皮细胞ECV304, MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞的侵袭能力进行检测。血管内皮细胞ECV304穿膜细胞数为 1.2 ± 0.91 个/视野, MDA-MB-231细胞穿膜细胞数为 29.5 ± 5.42 个/视野, MCF-7细胞穿膜细胞数为 8.3 ± 6.53 个/视野。各细胞间差异有统计学意义($F=3.927$, $P<0.05$)。MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞穿膜细胞均比正常对照血管内皮细胞ECV304多, MDA-MB-231细胞更为明显。

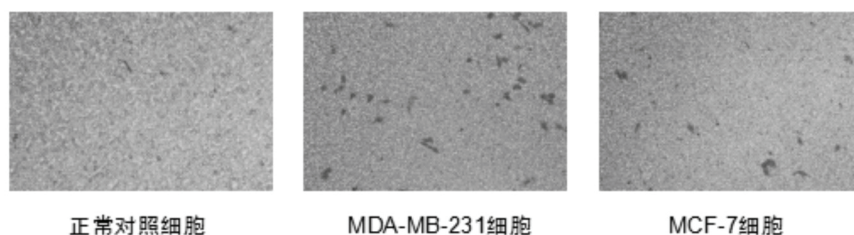


图5 MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞Transwell侵袭试验图

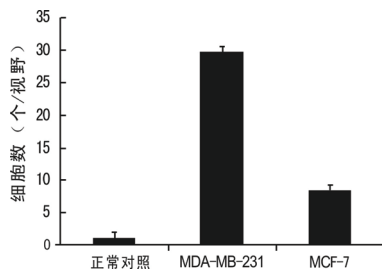


图6 乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞侵袭试验结果

3 讨论 Stathmin 蛋白是一种基因定位在染色体 1p36.11 上的小分子磷酸化蛋白。由 149 个氨基酸组成,相对分子质量约为 19KDa。由 N 端的结构调节域、中心区和 C 端的蛋白相互作用结构域三部分构成。N 端有 4 个丝氨酸磷酸化位点,分别是 Ser16, Ser25, Ser38 和 Ser63^[8]。Stathmin 的磷酸化和去磷酸化影响了细胞微管的聚合和解聚。Stathmin 的表达水平和细胞的生物学特性息息相关。

恶性肿瘤的侵袭及转移是一个多因素、多步骤、多阶段的复杂过程,主要包括肿瘤细胞之间和肿瘤细胞与细胞外基质之间的多个环节。大量的研究表明,Stathmin 基因的表达水平与恶性肿瘤的侵袭、转移过程中的各个环节密切相关^[9]。在体外试验中发现^[10],Stathmin 的表达水平增加或其活性增强能够促进肉瘤细胞的迁移及运动,并且在动物模型中进一步证实了 Stathmin 蛋白可以促进肿瘤局部组织的浸润以及远处转移,Stathmin 蛋白的具体作用机制与 ECM 相关。同时,Stathmin 蛋白可以通过磷酸化修饰调控微管的聚合而影响肿瘤细胞的运动能力^[11]。微管解聚蛋白 Stathmin 在肿瘤血管的形成中也发挥重要的调控作用。研究表明,通过抑制 Stathmin 的表达,可以稳定微管状态,抑制肿瘤血管的生成^[12]。Stathmin 的表达水平能够影响肿瘤细胞与细胞外基质相互作用、肿瘤细胞运动和肿瘤新生血管形成,在肿瘤转移的过程中发挥重要作用。

在本实验中,两种乳腺癌细胞 Stathmin 表达水平均高于正常对照细胞,且 Stathmin 表达水平在两种乳腺癌细胞中不同,Stathmin 表达高的 MDA-MB-231 细胞侵袭性更强,而 Stathmin 表达水平低的 MCF-7 细胞侵袭性较弱。上述实验结果说明,Stathmin 表达水平和乳腺癌细胞侵袭密切相关,为深入探讨乳腺癌转移的机制提供了实验依据。

参考文献:

[1] De Santis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 52-

62.

- [2] 张柏林,张倩, Sivasubramaniam PG, 等. 中国年轻乳腺癌发病危险因素-多中心十年回顾性研究[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(12): 1042-1047.
Zhang BL, Zhang Q, Sivasubramaniam PG, et al. The risk factors of breast cancer in young women in china: a multi-center ten-years retrospective study[J]. Chinese Cancer, 2015, 24(12): 1042-1047.
- [3] Lin H, Lin D, Xiong XS. Roles of human papilloma-virus infection and stathmin in the pathogenesis of sinonasal inverted papilloma[J]. Head Neck, 2016, 38(2): 220-224.
- [4] Ying L, Su D, Zhu J, et al. Genotyping of stathmin and its association with clinical factors and survival in patients with ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1315-1320.
- [5] Werner HM, Trovik J, Halle MK, et al. Stathmin protein level, a potential predictive marker for taxane treatment response in endometrial cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90141.
- [6] Nie W, Xu MD, Gan L, et al. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer[J]. Lab Invest, 2015, 95(1): 56-64.
- [7] Hemdan T, Linden M, Lind SB, et al. The prognostic value and therapeutic target role of stathmin-1 in urinary bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2014, 111(6): 1180-1187.
- [8] Miceli C, Tejada A, Castaneda A, et al. Cell cycle inhibition therapy that targets stathmin in vitro and in vivo models of breast cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(5): 298-307.
- [9] Liu X, Liu H, Liang J, et al. Stathmin is a potential molecular marker and target for the treatment of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 6502-6509.
- [10] Berton S, Pellizzari I, Fabris L, et al. Genetic characterization of p27(kip1) and stathmin in controlling cell proliferation in vivo[J]. Cell Cycle, 2014, 13(19): 3100-3111.
- [11] Lu Y, Liu C, Xu YF, et al. Stathmin destabilizing microtubule dynamics promotes malignant potential in cancer cells by epithelial-mesenchymal transition[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(4): 386-394.
- [12] Allen MM, Douds JJ, Liang SX, et al. An immunohistochemical analysis of stathmin 1 expression in uterine smooth muscle tumors: differential expression in leiomyosarcomas and leiomyomas[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 2795-2801.

收稿日期: 2016-05-12

修回日期: 2016-06-23