

乳腺癌细胞株中 MKK4 的表达及其对细胞转移的影响和机理研究 *

辛晓洁¹ 戴 功^{1△} 严 涛² 王传栋³ 钟 文²

(1 潍坊医学院 山东 潍坊 261053 2 潍坊市人民医院 山东 潍坊 261000; 3 安丘市人民医院 山东 潍坊 262100)

摘要 目的 :观察乳腺癌细胞株中 MKK4 蛋白的表达水平 ,研究 MKK4 蛋白表达对乳腺癌细胞运动能力及 EMT 标志物的影响 ,确定 MKK4 在肿瘤细胞 EMT 转化及肿瘤转移中的作用 ,为肿瘤转移机制研究提供一定的基础资料 ,为肿瘤防治奠定一定的理论基础。方法 :通过体外细胞培养技术收集系列乳腺癌细胞株的培养裂解液 ,利用 Western blot 技术检测细胞培养裂解液中 MKK4 及 EMT 标志物的表达水平 ,构建 MKK4 表达水平与细胞转移能力的对应图 ;采用 siRNA 技术 ,干扰 MKK4 高表达乳腺癌细胞株 MKK4 的表达 ,Western blot 技术观察 MKK4 低表达后 ,EMT 标志物的变化 ,同时 ,构建 MKK4 质粒 ,转染 MKK4 低表达乳腺癌细胞株 ,Western blot 技术观察 MKK4 高表达后 ,EMT 标志物的变化。并采用 MTT 法、Transwell、划痕法观察 MKK4 高表达后细胞增殖、运动、迁移等能力的变化。结果 :乳腺癌细胞株中 MKK4 蛋白的表达水平与乳腺癌细胞运动能力有一定的相关性 ,并与 EMT 标志物的表达具有相关性 ,MKK4 蛋白表达越高 ,细胞运动能力越差。干扰或转染技术影响乳腺癌细胞株中 MKK4 的表达后 ,细胞 EMT 标志物的表达也相应变化 ,乳腺癌细胞株中 MKK4 高表达后 ,其细胞增殖明显抑制 ,运动迁移能力也相应下降。结论 :乳腺癌细胞中 MKK4 蛋白的表达水平与乳腺癌细胞 EMT 转化及运动能力有一定的相关性 ,MKK4 蛋白表达越高 ,细胞运动能力越差。

关键词 MKK4 ;EMT ;肿瘤转移 ;siRNA ;Transwell

中图分类号 :R737.9 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011) 20-3841-04

Role of MKK4 in Breast Cancer and Its Relationship with Tumor Metastasis*

XIN Xiao-jie¹, DAI Gong^{1△}, YAN Tao², WANG Chuan-dong³, ZHONG Wen²

(1 Weifang Medical University, 261053, Weifang, China ;2 Weifang people's hospital, 261000, Weifang, China;

3 Anqiu people's hospital, 262100, Anqiu, China)

ABSTRACT Objective: To observe MKK4 protein expression level of MKK4 and its role in tumor cell transformation and tumor metastasis and to provide some basic data for cancer prevention and control. **Methods:** In vitro cell culture technology was employed to collect series of lysate of breast cancer cell lines. Western blot was used to detect the expression level of MKK4 and EMT markers. Structure the corresponding chart for MKK4 expression levels and transforming abilities. siRNA technology was used to interfere MKK4 expression in MKK4 high expression breast cancer cell lines. Western blot technique was then used to observe EMT markers when MKK4 expressed low. At the same time, built MKK4 plasmid then transfected MKK4 into breast cancer cell lines with low expression, and observed EMT changes when MKK4 expressed high. And MTT method, Transwell, and wound healing assay were used to observe capacity changes of cell proliferation, movement and migration. **Results:** MKK4 protein expression level was correlated with the breast cancer cell motility and the expression of EMT markers. The higher MKK4 expressed, the worse the cell movement capability was. EMT markers showed corresponding changes in breast cancer cells when interference or transfection influenced expression of MKK4 in breast cancer cell lines. With high expression of MKK4, cell proliferation was significantly inhibited and the migration capability was correspondingly reduced. **Conclusion:** There was a correlation between the protein expression level of MKK4 in breast cancer cell lines and the transformation and movement capability of EMT. The higher the expression of MKK4, the worse the moving capability of cells.

Key words: MKK4; EMT; Tumor metastasis; siRNA ;Transwell

Chinese Library Classification: R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3841-04

前言 严重威胁女性健康。近年来 ,有关乳腺癌诊断、手术、局部或系统放化疗等方法取得了显著的进步 ,肿瘤患者手术后生存期获得了较大的提高。但转移是肿瘤的恶性特征之一 ,转移和复发

* 基金项目 :山东省教育厅课题(J08LG76)
作者简介 :辛晓洁(1987-) ,女 ,硕士 ,主要研究方向 :分子药理学。E-mail:xjxin@jding.dhs.org
△通讯作者 :戴功 ,男 ,博士生导师 ,副教授。E-mail: Daigong@wfmc.edu.cn
(收稿日期 :2011-04-20 接受日期 :2011-05-17)

是导致肿瘤治疗失败的主要原因。

MKK4(也称为 JNKK1、SEK1)基因在 1995 年 2 个课题组几乎同时鉴定和克隆^[1]。Rinker-Schaeffer 课题组定义 MKK4 为一个染色体 17 编码的肿瘤转移抑制基因。MKK4 是 MAPK/JNK 信号转导途径中的一种信号分子,可激活 JNK 或 p38,引发一系列生物效应如细胞分化、生长和死亡^[2]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 pcDNA3.1-MKK4-Flag(MKK4 的 36-399 位氨基酸的基因序列)。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MCF-7、T47D、BT474、Bcap37、HCC1937,人乳腺导管细胞 ZR-75-30。

1.1.3 试剂 胎牛血清、DMEM 培养基、1640 培养基、L15 培养基、胰蛋白酶由 Gibco 公司提供,SEK1/MKK4 Antibody、Phospho-SEK1/MKK4(Ser80) Antibody 由 Cell Signaling Technology 提供;由 E-cadherin Antibody、N-cadherin Antibody 由 BD 公司提供;Vimentin Antibody、Pan-cytokeratin Antibody 由 abcam 公司提供;GAPDH Antibody 由康成生物提供;转染试剂 X-tremeGENE HP 由 Roche 提供;干扰试剂 Oligofectamine Transfection Reagent 由 invitrogen 公司提供,MKK4 干扰片段由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 不同乳腺癌细胞株中 MKK4 的表达 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MCF-7、T47D、BT474、Bcap37、HCC1937,人乳腺导管细胞 ZR-75-30,均由中科院上海药物研究所冻存。复苏培养,传 2~3 代,细胞状态良好时时收取样品,Western Blot 检测细胞株中 MKK4 蛋白水平的表达。并观察 MKK4 蛋白水平与肿瘤转移性的关系。

1.2.2 siRNA 干扰 MKK4 观察细胞变化 取 MKK4 高表达细胞株 MCF-7 细胞 1.5×10^5 孔种于六孔板,24 小时后进行 siRNA 干扰。每孔用生理盐水洗 2 次, opti-MEM 培养液洗一次,再加入 800 μ L opti-MEM, 5 μ L siRNA 稀释于 175 μ L opti-MEM 中,而 4 μ L oligofectamine 稀释于 16 μ L opti-MEM,混匀,静置 7 分钟后二者混合放置 20 分钟,立即加入六孔板中,摇匀,培养箱中放置 5 小时,换正常培养液继续培养 48 小时,收取样品 Western Blot 检测 MKK4 蛋白表达水平,并观察与肿瘤转移性相关的蛋白。

1.2.3 转染 MKK4 真核表达质粒观察细胞变化

1.2.3.1 细胞转染 取 MKK4 低表达细胞株 MDA-MB-231 细胞 1.5×10^5 孔种于六孔板,当细胞达到 50%-70%时,将 pcDNA3.1-MKK4 转染近细胞中。pcDNA3.1 作为对照组,空白组只加转染试剂,不转入任何质粒。

每孔用生理盐水洗 2 次, opti-MEM 培养液洗一次,再加入 1800 μ L opti-MEM, 2 μ gDNA 加 6 μ L X-tremeGENE 稀释于 200 μ L opti-MEM 中,混匀,静置 20min 后滴加入六孔板中,摇匀,培养箱中放置 5 小时,换正常培养液继续培养 30 小时。收取样品 Western Blot 检测转染效率。

1.2.3.2 肿瘤转移相关分子的变化 Western Blot 检测转染

MKK4 的 MDA-MB-231 细胞的肿瘤转移相关蛋白的变化。

1.2.3.3 细胞生长曲线 在 100 mm 培养皿中转染空白组、pcDNA3.1 空载、pcDNA3.1-MKK4-Flag 进入 MDA-MB-231 细胞,24h 后消化细胞配制成 6×10^5 细胞/ml 悬液,按 6×10^5 细胞/皿接种到 24 孔板中,继续培养 24、48、72h 后收集细胞。吸去培养液,PBS 洗涤一次,加入 1ml 胰酶,室温消化 3-5 min 后加入 1ml 含 10%FBS 的培养液,制成均匀单细胞悬液。细胞计数仪计数,每个样品计数 3 次。

1.2.3.4 细胞体外迁移实验 细胞转染后 24h,胰酶消化,用新鲜培养液稀释成 2×10^5 细胞/ml 的细胞悬液,以每组 2 个平行孔,每孔 1mL 接种 12 孔板,37° C、5% CO₂ 培养 12h 使细胞贴壁,均匀的长成一层后,用一个 200 μ L 的塑料吸头在每个孔的中央划一条直线,直线尽量同等粗细,划完后吸掉培养基,PBS 洗涤一次,去掉被刮起的细胞。小心加入 1mL 预热的含 10% FBS 的 L15 培养基,继续培养,每隔 3h 在 10 倍物镜 $\times 10$ 被目镜下显微拍照一次,比较细胞迁移速率。

$$\text{细胞迁徙率} = \left(1 - \frac{\text{终止时划痕宽度}}{\text{起始时划痕宽度}} \right) \times 100\%$$

1.2.3.5 细胞体外侵袭实验 取转染后 24h 的 MDA-MB-231 细胞,胰酶消化收集细胞,离心(1000rpm/5min)弃上清,无血清 L15 洗涤一次,加入无血清 L15 配成 10×10^5 细胞/ml 液;上室每孔加入 100 μ L 细胞悬液,下腔室中加入 600 μ L L15+10%FBS 培养,37°C 空气培养箱中,培养 24h;用 90%乙醇室温固定 0.5 小时,结晶紫(0.1%)室温染色 0.5h,用蒸馏水洗 3 遍,用脱脂棉擦去上表面细胞,晾干后显微镜下观察,10 \times 物镜取 5 个视野照相。然后用 10%乙酸 100 μ L/孔室温抽提 10min,抽提液 600nm 测 OD 值,计算 Mock、MKK4 组相对 Control 组的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{处理组 OD 值}}{\text{Control 组 OD 值}} \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 乳腺癌细胞株 MKK4 表达水平检测

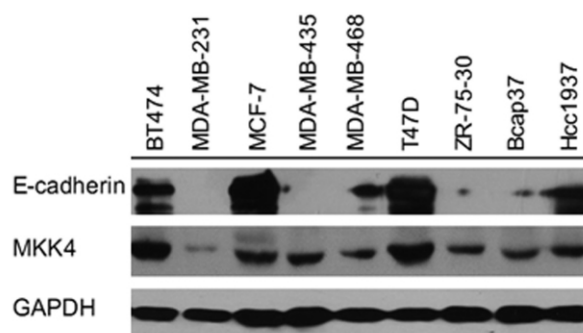


图 1 乳腺癌细胞株中 MKK4 蛋白表达水平检测

Fig. 1 Expression profiling of MKK4 in Breast Cancer Cell Lines

细胞株 BT474、MDA-MB-231、MCF-7、MDA-MB-435、MDA-MB-468、T47D、ZR-75-30、Bcap37、Hcc1937 MKK4 基因表达水平检测发现,MKK4 高表达的细胞株中,EMT 标记蛋白 E-cadherin 也高表达。

2.2 MCF-7 细胞中干扰 MKK4 后 EMT 标记基因的变化

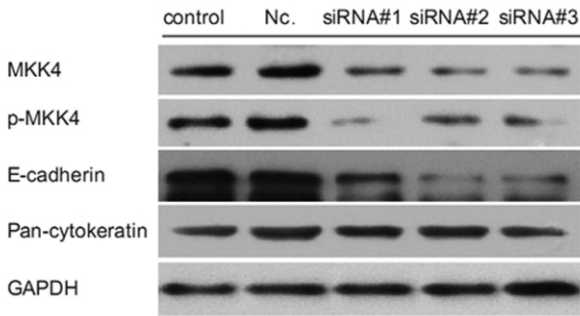


图2 MCF-7 细胞干扰 MKK4 后 EMT 标记基因的变化

Fig. 2 EMT markers change when MKK4 is knockdown in MCF-7

从图中可以看出 siRNA#1、siRNA#2、siRNA#3 均对 MKK4 蛋白水平表达有明显的下调,其中 siRNA#3 作用最明显。检测 E-cadherin 和 Pan-cytokeratin 后发现,当 MKK4 蛋白表达被干扰后,E-cadherin 表达明显下调,Pan-cytokeratin 有下调,但下调不明显。干扰效应最显著的 siRNA#3 与 Nc.组相比 E-cadherin 和 Pan-cytokeratin 均下调。

2.3 MDA-MB-231 细胞转染

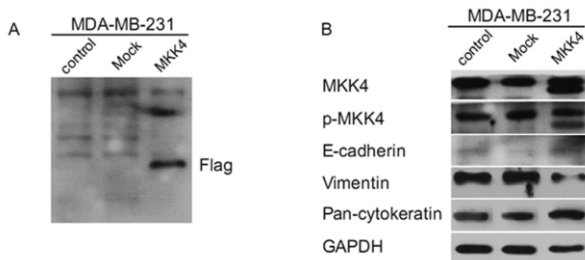


图3 转染 MKK4 后 MDA-MB-231 细胞株 EMT 标记蛋白的变化

Fig. 3 EMT markers change when MKK4 is transfected in MDA-MB-231

转染后 MKK4 后,MKK4 组检测到了 Flag 标签的表达,大小约为 44kd,刚好符合 MKK4-Flag 融合蛋白的大小,Control 和 Mock 并未检测到此蛋白的表达。

进一步检测转染后 MDA-MB-231 细胞中 EMT 相关标记蛋白的变化,发现,MKK4 高表达,其磷酸化水平增多,相应的 E-cadherin、Pan-cytokeratin 上调,Vimentin 表达量减少,EMT 现象出现一定的逆转。

2.4 MDA-MB-231 细胞株生长曲线

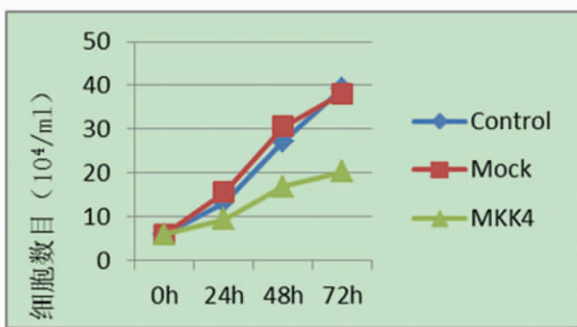


图4 转染 MKK4 后 MDA-MB-231 细胞株生长曲线

Fig. 4 Cell growth curve of MDA-MB-231 after transfection of MKK4

MDA-MB-231 转染 MKK4 后,细胞生长速度变慢,从细胞生长曲线可以看出,转染 MKK4 后曲线斜率小于 Control 组与 Mock 组,而 Control 组与 Mock 组之间没有太大差别。说明转

染 MKK4 后细胞生长速度变慢,这种变慢是由于 MKK4 引起的而不是转染试剂的毒性引起的。即 MKK4 对细胞有增殖抑制的作用。

2.5 转染 MKK4 对 MDA-MB-231 运动能力的影响

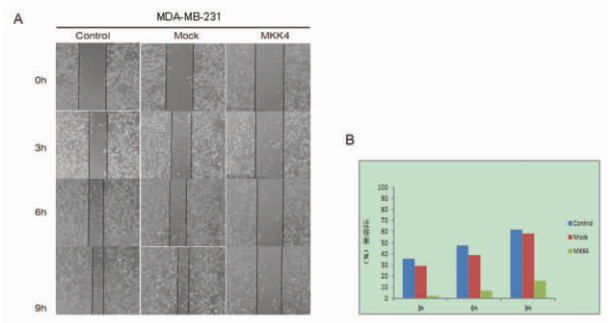


图5 转染 MKK4 后 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

Fig.5 The effect on MDA-MB-231 cell migration after transfection of MKK4

图 5(A)不同时间点 MDA-MB-231 个处理组愈合划痕的照片,从图 5(A)中可以看出,MKK4 组的愈合能力低于 Control 组、Mock 组。图 5(B)是运用公式,每组在不同时间点的划痕宽度与 0h 划痕宽度相比,计算迁移率。在时间点 3h、6h、9h,MKK4 组迁移率明显低于 Control 组和 Mock 组,Control 组和 Mock 组之间没有太大差别。说明转染 MKK4 后 MDA-MB-231 细胞的迁移能力减弱。

2.6 转染 MKK4 对 MDA-MB-231 侵袭能力的影响

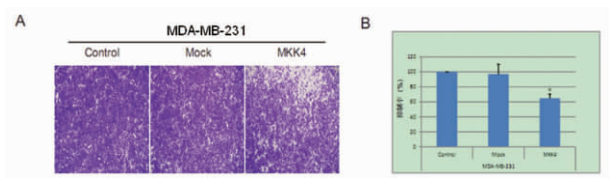


图6 MKK4 基因对 MDA-MB-231 侵袭功能的影响

Fig.6 The role of MKK4 in MDA-MB-231 cell invasion

图 6 (A) 是 Transwell 实验中,在 100 倍显微镜下 MDA-MB-231 侵袭到下室的照片,图 6(B)是 10%乙酸抽提结晶紫测 OD 值,测细胞侵袭数并进行计数统计的结果,以 Control 迁移的细胞数为百分之百,Mock 组和 MKK4 组以 Control 组为标准换算成百分数。

在细胞因子的诱导下,Control 组、Mock 组和 MKK4 组都能够从 transwell 膜的上室通过小孔运动到下室,但是发生迁移的细胞数明显不同,MKK4 组迁移的细胞数少于 Control 组和 Mock 组 (*P<0.05),Control 组和 Mock 组之间没有太大差别。说明转染 MKK4 后 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力减弱。

3 讨论

肿瘤转移是指肿瘤细胞从原发部位向远处器官扩散并无限增生的过程,是一个极其复杂的过程,主要包括恶性肿瘤细胞从原发灶脱离,浸润侵袭基底膜并在周围间质中生长,与周围毛细血管或毛细淋巴管内皮细胞接触并穿透基底膜,在血管、淋巴管内继续存活并随之转运,到达靶器官,在合适的条件下诱导增殖并生成血管,最终形成转移灶等过程^[3]。在肿瘤转移过程中,基底膜是肿瘤转移过程中的一道重要的物理屏障,而

肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用有助于肿瘤细胞穿过基底膜^[4]。

最新研究发现,细胞上皮-间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在诱发和促进肿瘤转移中发挥了重要作用。EMT是指在生理及病理情况下发生细胞上皮-间质转变,同时伴随细胞形态与相关基因表达的改变。上皮细胞具有极性,细胞间的黏附连接和紧密连接使上皮细胞紧密相连,同时限制了细胞的迁移能力。当在某些因素的作用下上皮细胞会丢失紧密黏附的极性,而转化成具有间质细胞形态特征时,即具有了浸润和转移的能力^[5]。EMT最重要的标志性变化是E-cadherin的减少或丢失^[6]。EMT还伴有间质细胞来源蛋白质的重新表达或表达水平增加,如Vimentin、Fibronectin^[7]等。这些间质细胞来源蛋白质的重新表达或表达水平增加与肿瘤的侵袭密切相关^[8]。

已有的研究表明MKK4基因在肿瘤发生发展中发挥非常重要的调节作用。但研究结果不相同,一部分研究支持MKK4为抑癌基因,具有肿瘤抑制作用,或认为MKK4为转移抑制基因,对肿瘤具有转移抑制作用;然而,另外一种观点去截然相反,他们认为MKK4是癌基因,能促进肿瘤的生长。但这些都表示MKK4作为JNK和P38通路的上游激酶,在肿瘤发生及转移过程中有复杂的作用。

MKK4的功能缺失可能在原位瘤的形成过程中起着重要作用,也可能与肿瘤发展进程的更高阶段有联系。研究发现,MKK4的损伤表达可以促进前列腺癌和卵巢癌的转移^[9,10],降低MKK4的mRNA水平可以导致乳腺癌的脑转移^[11],在正常前列腺组织的上皮部分有高水平的MKK4蛋白表达,在间充质部分没有。而在新生瘤的前列腺组织MKK4的表达减少,且MKK4表达水平的减少与前列腺癌的转移潜能呈正相关^[12]。提示MKK4的低表达增加了肿瘤转移能力。

尽管不断有大量的研究支持MKK4在肿瘤转移抑制和肿瘤抑制中的作用,但是也有学者研究指出MKK4为癌基因,具有致肿瘤作用。Wu等^[13]研究发现在96例胃癌患者的胃癌组织标本中高表达MKK4蛋白的患者与MKK4低表达甚至不表达的患者相比,高表达MKK4的患者的总的生存期和无复发生存率均较差。联合抑制MKK4/JNK通路和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/Akt通路能降低H1299细胞株的增殖,将MKK4/JNK和PI3K/Akt通路的抑制剂共同注入H1299嫁接的肿瘤内,肿瘤的体积明显减小^[14],这也说明了MKK4的致肿瘤作用,可能是原癌基因。

乳腺癌细胞株MKK4基因蛋白表达水平检测发现,BT474、MCF-7、T47D细胞株EMT标记蛋白E-cadherin高表达,相应的MKK4表达量高于其他细胞株。MKK4基因乳腺癌细胞株中蛋白水平的表达与E-cadherin有一定的正相关性,文献证实E-cadherin的表达与肿瘤的侵袭能力呈负相关,其表达下调增加了肿瘤的恶变率。近年来,乳腺癌、胃癌和结直肠癌等研究证实E-cadherin表达降低与肿瘤的分化、侵袭和转移有显著的相关性^[14]。MKK4有可能抑制肿瘤的分化、侵袭和转移。

干扰MCF-7细胞株中MKK4蛋白的表达后,出现EMT现象。肿瘤细胞运动能力增强。转染MKK4后,MDA-MB-231细胞EMT现象出现逆转。从细胞生长曲线实验可以看出MKK4对细胞的增值有抑制作用,从细胞行为学上看,细胞生长速度、迁移侵袭能力都明显下降。MKK4表现为抑制肿瘤细

胞增值和转移的作用。具体机制还需要进一步研究探讨。

通过本文研究发现乳腺癌细胞中MKK4蛋白的表达水平与乳腺癌细胞EMT转化及运动能力有一定的相关性,MKK4蛋白表达越高,细胞运动能力越差。MKK4有可能抑制肿瘤的分化、侵袭和转移,在乳腺癌中,作为一个抑癌基因存在。本研究明确了MKK4在乳腺癌细胞EMT转化及乳腺癌细胞转移中的作用,不仅为乳腺癌转移机制研究提供一定的基础资料,并且为乳腺癌防治奠定一定的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms[J]. Science, 1995, 268(5198):682-685
- [2] Robinson VL, Hickson JA, Vander Griend DJ, et al. MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and metastasis research [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(1):25-30
- [3] Fidler Isaiah J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 453-458
- [4] Koshikawa. Overexpression of laminin gamma2 chain monomer in invading gastric carcinoma cells [J]. Cancer Res, 1999, 59 (21): 5596-5601
- [5] Axel B, Wolfram J, Maria S, et al. Oncogenic transformation by raf is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation [J]. Oncogene, 2000, 19(22): 2633-2657
- [6] Wells A, Yates C, Shepard C R. E-cadherin: an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the Beta-static seeding of disseminated carcinomas[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25 (6): 621-628
- [7] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2):151-166
- [8] Xin W, Yun KJ, Ricci F, et al. MAP2K4/MKK4 expression in pancreatic cancer: genetic validation of immunohistochemistry and relationship to disease course [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(10): 8516-8520
- [9] Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmareva MA, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/ERK kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17[J]. Cancer Res, 1999, 59: 5483-5487
- [10] Yamada SD, Hickson JA, Hrobowski Y, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62: 6717-6723
- [11] Stark AM, Tongers K, Maass N, et al. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131:191-198
- [12] Kim HL, Vander Griend DJ, Yang X, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 metastasis suppressor gene expression is inversely related to histological pattern in advancing human prostatic cancers [J]. Cancer Res, 2001, 61: 2833-2837
- [13] Lee H Y, Oh S H, Suh Y A, et al. Response of non-small cell lung cancer cells to the inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt2 and MAPK kinase 4/ c-Jun NH-2terminal kinase pathways: an effective therapeutic strategy for lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (16):6065-6074
- [14] Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract[J]. Gastroenterol, 2008, 14(24): 3792-3797