

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.009

DJ-1 基因 siRNA 对三阴性乳腺癌细胞侵袭和迁移影响的研究 *

方 茅¹ 龙 捷¹ 王红艳¹ 谢晓斌¹ Thoidingjam Bidyarani Chanu² 陈启宪³

(1 广州医学院病理教研室 广东 广州 510182; 2 广州医学院国际学院 广东 广州 510182;

3 广州医学院第三临床学院 广东 广州 510182)

摘要 目的:探讨 DJ-1 基因 siRNA 对三阴性乳腺癌细胞体外侵袭和迁移能力的影响。**方法:**设计 DJ-1 基因的小分子干扰 RNA (siRNA) 片段, 脂质体介导转染入三阴性乳腺癌细胞株 MAD-MB-231, 转染分 3 个组: A 组(空白对照 control 组)、B 组(转染非特异性对照 Scramble 组)、C 组(转染 si DJ-1 组)。应用 Western blotting 免疫印迹法检测转染前后 DJ-1 表达水平; 运用细胞迁移和侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力的变化。**结果:** C 组 DJ-1 蛋白的表达强度弱于 A 组和 B 组($t=9.831, P<0.05$), 而 A 组与 B 组比较, DJ-1 蛋白表达水平则无明显差异 ($t=1.629, P>0.05$)。细胞迁移实验中, A 组细胞为 (218.37 ± 12.75); B 组的细胞为 (214.46 ± 11.38); C 组的细胞为 (129.65 ± 8.59), C 组细胞明显少于 A 组和 B 组($t=10.927, 9.984, P<0.05$), 而 A 组与 B 组之间, 差异无统计学意义($t=0.512, P>0.05$)。细胞侵袭实验中, A 组细胞为 (127.28 ± 12.65); B 组的细胞为 (123.06 ± 13.08); C 组的细胞为 (52.85 ± 9.58), C 组穿过人工基底膜的细胞明显少于 A 组和 B 组($t=7.927, 8.643, P<0.05$), 而 A 组与 B 组之间, 差异无统计学意义($t=0.627, P>0.05$)。**结论:** DJ-1 基因 siRNA 可抑制三阴性乳腺癌细胞侵袭和迁移。

关键词: DJ-1; 三阴性乳腺癌; 迁移; 侵袭; RNA 干扰技术

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)07-1239-04

Influence of RNA Interference Induced Silencing of DJ-1 Gene on Migration and Invasion Potential in Triple-Negative Breast Cancer Cells*

FANG Mao¹, LONG Jie¹, WANG Hong-yan¹, XIE Xiao-bin¹, Thoidingjam Bidyarani Chanu², CHEN Qi-xian³

(1 Pathology Department, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China;

2 Internation School of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong, 510182, China;

3 The third clinical college of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of RNA interference induced silencing of DJ-1 gene on migration and invasion potential in triple-negative breast cancer cells. **Methods:** Human breast cancer cells MAD-MB-231 were divided into control group(A group), Scramble group(B group) and si DJ-1 group(C group). siRNA sequence targeting DJ-1 gene were designed and synthesized. The siRNA were transfected into triple-negative breast cancer cell by lipofectamine TM 2000 mediation. The alteration of DJ-1 protein expression was detected by western blotting. Invasion potential were evaluated by transwell invasion assay, Cell migrating ability was detected by transwell migration assay. **Results:** Transfection of DJ-1 siRNA significantly knocked down the DJ-1 protein expression, The migration and invasion of breast cancer cells declined after transfection with siRNA DJ-1, DJ-1 protein expression of C group was lower than that of A group and B group ($t=9.831, P<0.05$). There was no difference between A group and B group ($t=1.629, P>0.05$). In cell migration assay, the number of cells in C group (129.65 ± 8.59) was less than that in A group (218.37 ± 12.75) and B group (214.46 ± 11.38) ($t=10.927, 9.984, P<0.05$). There was no difference between A group and B group ($t=0.512, P>0.05$). In cell migration assay, the number of cells in C group(129.65 ± 8.59) was less than that in A group(218.37 ± 12.75) and B group(214.46 ± 11.38) ($t=10.927, 9.984, P<0.05$). There was no difference between A group and B group ($t=0.512, P>0.05$). In invasion potential test, the number of cells in C group(52.85 ± 9.58) was less than that in A group (127.28 ± 12.65) and B group (123.06 ± 13.08) ($t=7.927, 8.643, P<0.05$). There were no difference between A group and B group ($t=0.627, P>0.05$). **Conclusions:** The siRNA targeting DJ-1 gene can restrain the migration and invasion of triple-negative breast cancer cell.

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2012040007232); 广州市属高校科研计划项目(2012C202)

广州医学院科学研究项目(L110503); 2012-2013 年度广州医学院大学生课外科技活动项目(2012A001; 2012A006)

作者简介: 方茅(1982-), 女, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向: 肿瘤病理学, 电话: 13632482704,

E-mail: 79336878@qq.com

(收稿日期: 2013-08-22 接受日期: 2013-09-15)

Key words: DJ-1; Triple-negative breast cancer; Migration; Invasion; RNA interference

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1239-04

前言

三阴性乳腺癌(Triple-negative breast cancer, TNBC)是一类侵袭性强且容易远处转移的高危乳腺癌,预后较其他类型的乳腺癌差;同时 TNBC 组织中 ER、PR、HER-2(雌激素受体、孕激素受体、人表皮生长因子受体 2)三者均为阴性表达,无法进行针对激素受体的内分泌治疗和针对 Her-2 的 Herceptin (Trastuzumab)靶向治疗,目前也没有专门针对 TNBC 的治疗指南供参考^[1-3]。三阴性乳腺癌治疗的难点在于发病机制不清,缺乏明确的治疗靶点。因此,探明三阴性乳腺癌的发病机制,寻找新的有效的 TNBC 的诊断分子标志物和治疗靶标是提高 TNBC 治疗效果的关键^[4,5]。DJ-1 基因是一种新的丝裂原依赖性癌基因,与多种恶性肿瘤演进与预后等相关,是潜在的肿瘤治疗靶点。研究发现, DJ-1 蛋白是一种关键的 PTEN 负性调节蛋白,而 PTEN 已证实是肿瘤浸润转移过程中关键调节蛋白, DJ-1 是否通过抑制 PTEN 调节肿瘤细胞的侵袭和迁移尚不清楚^[6-8]。本研究选择三阴性乳腺癌细胞株 MAD-MB-231 为模型,采用 siRNA DJ-1 转染三阴性乳腺癌细胞株 MAD-MB-231 后,通过迁移和侵袭实验分析 DJ-1 在 MAD-MB-231 细胞中的迁移侵袭作用,初步分析 DJ-1 基因调控三阴性乳腺癌细胞侵袭及迁移的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人三阴性乳腺癌 MAD-MB-231 细胞株, DJ-1 siRNA 正义链序列: 正义链序列 5'-GCUCUGUUGGCUCAUGAAATT-3', 由上海吉玛公司合成, 非特异随机序列由上海吉玛公司赠送, Scramble 正义链序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。RPMI-1640 培养基和 10%胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 脂质体 lipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司。BCA 法蛋白定量测定试剂盒海门碧云天生物技术公司。Transwell 实验所用的小室购自 Corning。Matrigel matrix 购自 BD。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人三阴性乳腺癌 MAD-MB-231 细胞培养于 RPMI-1640 培养基(FBS, Hyclone), 其中含 10%胎牛血清。将培养瓶置于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。

1.2.2 实验分组和转染 转染分 3 个组: A 组, 空白对照组: 未经任何处理的三阴性乳腺癌 MAD-MB-231 细胞。B 组, 转染非特异性对照组 Scramble RNA 20 nmol/L, C 组, 转染 si DJ-1 20 nmol/L。实验前 24 h, 将生长状态良好的 231 细胞接种于 6 孔细胞培养板; 转染时, B 组加入 Scramble RNA 20 nmol/L, C 组, 加入 si DJ-1 20 nmol/L, 均加入适量 Lipofect 2000TM; 5 min 后混匀, 室温下孵育 20 min 后滴加到 6 孔培养板中; 24 h 后收集细胞。

1.2.3 Western 印迹法 检测稳定转染细胞株中 DJ-1 蛋白表达变化。收集 siRNA 处理的细胞, 将 RIPA 细胞裂解液中加入细

胞培养板上, 注意让每个细胞接触到裂解液, 使其裂解完全, 提取细胞株的总蛋白, Bradford 法测蛋白含量, 进行 Western 印迹检测。

1.2.4 细胞迁移实验 取细胞悬液 2×10^5 /L 加入迁移小室(滤膜不包被细胞外基质胶), 常规培养 24 h。孵育结束后, 取出迁移小室, 弃去孔中培养液, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 无水乙醇固定并用结晶紫染小室滤膜下表面的细胞, 显微镜下($\times 100$)随机五个视野观察细胞并计数, 取其平均值作图分析结果。

1.2.5 细胞侵袭实验 按 6.7%的比例配置 20 μ L 含 MatrigelTM (细胞外基质胶)的培养液加入 Transwell 小室内, 使小室滤膜(直径 6.5mm, 孔径 8 μ m)内表面包被细胞外基质胶。细胞用 2.5%胰酶消化, 悬浮于无血清 RPMI-1640 培养基中, 调整细胞浓度为 1×10^6 /L。侵袭小室的上室中各加入 200 μ L 细胞悬液, 下室中加入 600 μ L 含 10% FBS 的 1640 培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 36 h。孵育结束后, 吸去上室液体, 用棉签擦去膜上未穿过聚碳酸酯膜小孔的细胞及 Matrigel 胶。甲醇固定并进行结晶紫染色穿过小孔细胞。显微镜下($\times 100$)随机五个视野观察细胞并计数, 取其平均值作图分析结果。

2 结果

2.1 Western 印迹法检测 DJ-1 蛋白的表达

C 组 DJ-1 蛋白的表达强度弱于 A 组和 B 组($t=9.831$, $P<0.05$), 而 A 组与 B 组比较, DJ-1 蛋白表达水平则无明显差异($t=1.629$, $P>0.05$, 图 1)。表明三阴性乳腺癌 231 细胞转染 siRNA 后 DJ-1 蛋白表达水平降低明显。

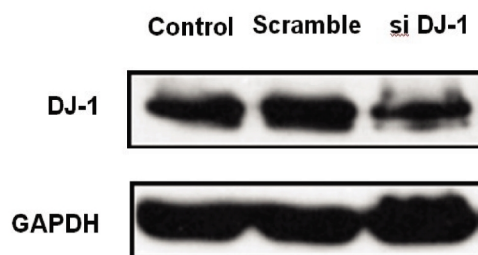


图 1 si DJ-1 处理 MDA-MB-231 细胞 24h 下调 DJ-1 的蛋白表达水平
Fig.1 Downregulation of DJ-1 expression in MDA-MB-231 cells treated with si DJ-1 for 24h

2.2 DJ-1-siRNA 对三阴性乳腺癌细胞株 231 体外迁移力和侵袭力的影响

细胞迁移实验中, C 组细胞明显少于 A 组和 B 组($t=10.927$, 9.984 , $P<0.05$), 而 A 组与 B 组之间, 差异无统计学意义($t=0.512$, $P>0.05$), 见表 1。说明 DJ-1 表达的下调抑制了三阴性乳腺癌细胞 MAD-MB-231 的运动能力, 经转染小分子干扰 RNA 后的三阴性乳腺癌细胞 MAD-MB-231 的迁移能力明显降低(图 2)。细胞侵袭实验中, C 组穿过人工基底膜的细胞明显少于 A 组

和 B 组($t=7.927, 8.643, P<0.05$), 而 A 组与 B 组之间, 差异无统计学意义($t=0.627, P>0.05$), 见表 1。说明 siRNA 干扰基因后, 三阴性乳腺癌细胞 MAD-MB-231 的侵袭能力有明显下降, 细胞穿膜数明显减少(图 3)。

表 1 Scramble RNA、si DJ-1 对 MDA-MB-231 细胞体外迁移力和侵袭力的影响

Table 1 The effect of scramble RNA and DJ-1-siRNA on migratory and invasive abilities of MDA-MB-231 cells

Groups	The number of migration cells	The number of invasion cells
A group(Control group)	218.37± 12.75a	127.28± 12.65a
B group (Scramble group)	214.46± 11.38a	123.06± 13.08a
C group (si DJ-1 group)	129.65± 8.59	52.85± 9.58

注: vs B 组, a $P<0.05$ 。

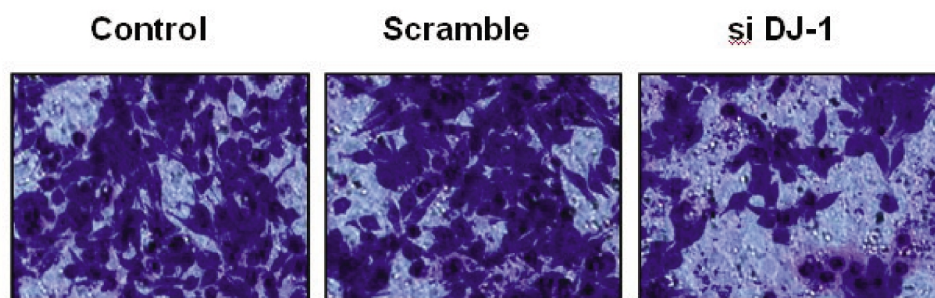


图 2 Scramble RNA、si DJ-1 处理 24h 下调 MDA-MB-231 cells 迁移能力

Fig.2 The effect of scramble RNA, si DJ-1 on migration abilities of MDA-MB-231 cells

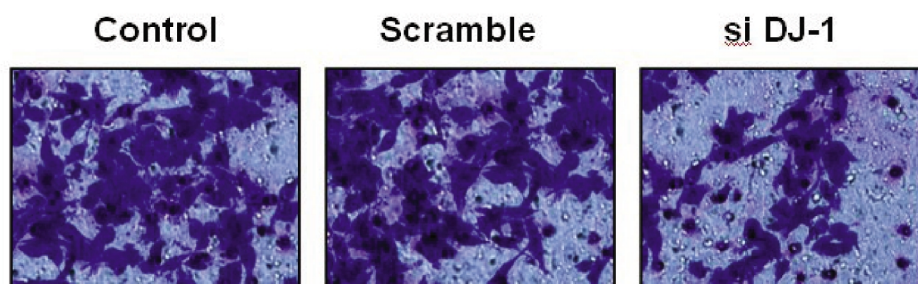


图 3 Scramble RNA、si DJ-1 处理 36h 下调 MDA-MB-231 cells 侵袭能力

Fig.3 The effect of scramble RNA and si DJ-1 on invasion abilities of MDA-MB-231 cells

3 讨论

DJ-1 基因是近年来发现的一种新的癌基因, 染色体定位于 1p36.2-36.3 位点, DJ-1 基因编码蛋白由 189 个氨基酸残基组成, 分子量约为 20kd。DJ-1 蛋白在人体各种组织中广泛表达, 具有参与细胞中多种病理生理过程的功能, 包括细胞生长、增殖、雄激素受体调控、调节转录、调控 RNA 结合复合体以及调控 RNA 水平和蛋白质水平参与细胞氧化应激反应等^[9,10]。迄今为止的研究结果认为, DJ-1 不仅参与多种肿瘤的发生过程, 同时也与恶性肿瘤演进与预后等密切相关, 是潜在的肿瘤治疗靶点^[11-13]。有研究发现, DJ-1 基因与乳腺癌侵袭转移有关^[14,15], 但 DJ-1 基因在三阴性乳腺癌中侵袭、转移中的分子机制尚不清楚。

在基因研究领域, RNAi 是近年来发现的一种调节 mRNA 的生物学现象, 其主要功能在于敲除基因的 mRNA 而调节和关闭相应基因的表达, 进而调控细胞的各种高级生命活动, 其

效果要远强于正义和反义 RNA, 已被广大科学工作者作为研究基因功能和基因治疗的工具^[16-18]。为探讨 DJ-1 基因在三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭中的作用, 本研究根据 DJ-1 基因 mRNA 特点, 设计了 siRNA 序列, 并转染三阴性乳腺癌细胞株 231 后, 采用 western blot 方法检测 DJ-1 蛋白表达水平, 结果发现转染组细胞 DJ-1 蛋白表达强度弱于空白对照组和转染非特异性对照组($t=9.831, P<0.05$), 表明三阴性乳腺癌 231 细胞转染 siRNA 后 DJ-1 蛋白表达水平降低明显。在体外观察 DJ-1 基因 siRNA 转染对三阴性乳腺癌细胞株 231 迁移和侵袭的影响实验中, 本研究分别采用迁移和侵袭实验法检测细胞迁移和侵袭能力的变化, 结果显示转染组迁移穿膜细胞数和侵袭穿膜细胞数均明显减少, 说明经 siRNA 干扰基因后, DJ-1 表达的下调, 对三阴性乳腺癌细胞 231 的迁移能力和侵袭能力具有明显抑制作用, 证明了 DJ-1 表达可能与三阴性乳腺癌的侵袭转移有关。我们推测 DJ-1 促进三阴性乳腺癌发展的作用可能与其能增加三阴性乳腺癌细胞迁移、侵袭能力有关。2008 年 Liu 等^[19]报道, DJ-1

蛋白通过抑制 PTEN 表达,促进 PI3K-Akt 通路的活化,进而促进细胞生长、增殖,促进肿瘤的发生。提示 DJ-1 在乳腺癌发生发展中的分子调控机制可能与 DJ-1 作用于 PI3K-Akt 通路有关,通过将来更为深入的研究,DJ-1 有望成为三阴性乳腺癌靶向治疗的新靶点^[20,21]。

综上所述,本研究结果提示,干扰 DJ-1 基因,可使 DJ-1 表达水平降低,同时 DJ-1 基因在人三阴性乳腺癌细胞迁移、侵袭中发挥着重要的作用,为其成为治疗三阴性乳腺癌的新靶点奠定了理论基础, DJ-1 相关生物学功能的机制及其在三阴性乳腺癌治疗中的应用价值有待进一步深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(15): 1938-1948
- [2] Amir E, Ocana A, Freedman O, et al. Chemotherapy: dose-dense treatment for triple-negative breast cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(2): 79-80
- [3] 陈玉娟, 王晓东, 汪静. 三阴乳腺癌的特征及治疗现状[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2012, 9(25): 21-25
Chen Yu-juan, Wang Xiao-dong, Wang Jing. Characters and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2012, 9(25): 21-25
- [4] 苏东玮, 施俊义, 盛媛, 等. P53、P16、Ki-67 对三阴乳腺癌预后的相关性研究[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 3(15): 104-105
Su Dong-wei, Shi Jun-yi, Sheng Yuan, et al. P53, P16, Ki-67 expression in triple-negative breast cancer and its prognostic significance[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 3(15): 104-105
- [5] 马杰, 魏冰, 杨科, 等. Top2A 基因及其蛋白与 Ki-67 蛋白在三阴乳腺癌患者中的检测意义[J]. *河南医学研究*, 2012, 3(15): 38-42
Ma Jie, Wei Bing, Yang Ke, et al. Detection and Significance of top2A gene, top2A protein and Ki-67 protein in triple negative breast cancer patients[J]. *Henan Medical Research*, 2012, 3(15): 38-42
- [6] Kahle PJ, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders [J]. *FreeRadical Biol Med*, 2009, 47(10): 1354-1361
- [7] Kim YC, Kitaura H, Taira T, et al. Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(6): 1331-1341
- [8] 孔德嘉, 杨学伟, 闫朝歧. PTEN 及 COX-2 在乳腺癌的表达、意义及相关性[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(17): 3280-3284.
Kong De-jia, Yang Xue-wei, Yan Zhao-qi. Expression, Clinical Significance and Relativity of Gene PTEN and COX-2 in Breast Carcinoma [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(17): 3280-3284
- [9] Rios J, Puhalla S. Categorization of triple-negative breast cancer patients will help in targeted therapy selection[J]. *Oncology (Williston Park)*, 2011, 25(8): 849
- [10] Tsuchiya B, Iwaya K, Kohno N, et al. Clinical significance of DJ-1 as a secretory molecule: retrospective study of DJ-1 expression at mRNA and protein levels in ductal carcinoma of the breast [J]. *Histopathology*, 2012, 61(1): 69-77
- [11] Adamo B, Anders CK. Stratifying triple-negative breast cancer: which definition(s) to use? [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(5): 105
- [12] Barua A, Edassery SL, Bitterman P, et al. Prevalence of antitumor antibodies in laying hen model of human ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(4): 500-507
- [13] Arnouk H, Merkley MA, Podolsky RH, et al. Characterization of molecular markers indicative of cervical cancer progression[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2009, 3(5): 516-527
- [14] Le Naour F, Misek DE, Krause MC, et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11): 3328-3335
- [15] Tillman J E, Yuan J, Gu G, et al. DJ-1 binds androgen receptor directly and mediates its activity in hormonally treated prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4630-4637
- [16] Barrel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions[J]. *Cell*, 2009, 136(3): 215-233
- [17] Wu HL, Zhu SM, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer[J]. *Cell Res*, 2009, 19(6): 439-448
- [18] Ruebel K, Leontovich A A, Stilling G A, et al. MicroRNA expression in ileal carcinoid tumors: downregulation of microRNA-133a with tumor progression[J]. *Modern Pathol*, 2010, 23(11): 367-375
- [19] Liu H, Wang M, Li M, et al. Expression and role of DJ-1 in leukemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3): 477-483
- [20] 黄金, 吴正升, 张晴, 等. 乳腺癌 miRNAs 表达谱的检测[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(2): 173-177
Huang Jin, Wu Zheng-sheng, Zhang Qing, et al. MicroRNA expression profile in breast cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010, 26(2): 173-177
- [21] Hinkle DA, Mullett SJ, Gabris BE, et al. DJ-1 expression in glioblastomas shows positive correlation with P53 expression and negative correlation with epidermal growth factor receptor amplification[J]. *Neuropathology*, 2011, 31(1): 29-37