

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.001

· 基础研究 ·

癌睾丸抗原 TFDP3 与乳腺癌上皮间质化(EMT)的相关性研究*

肖 鹏^{1#} 初 明^{1#} 孙泽文¹ 杜毅聪¹ 张明波² 徐 兰¹ 初正云² 陈 雪¹
何嘉颢¹ 丁玲昱¹ 焦运燊¹ 王月丹^{1△}

(1 北京大学医学部基础医学院 北京 100191; 2 辽宁中医药大学药学院 辽宁 沈阳 110032)

摘要 目的:本研究探讨了癌睾丸抗原 TFDP3 与乳腺癌细胞上皮间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关系。**方法:**本研究中选取了乳腺癌细胞系(MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3 和 MDA-MB-231)作为研究对象,通过 Western Blot 的方法筛选获得了 TFDP3 低水平表达的乳腺癌细胞株。进一步通过质粒转染的方式构建 TFDP3 过表达的细胞系模型,观察 TFDP3 在 EMT 中的作用。**结果:**TFDP3 在 MCF-10A 及 SK-BR-3 中不表达,在间质化程度较高的 MDA-MB-231 中高水平表达,而在上皮化程度较高的 MCF-7 中的低水平表达。MCF-7 中过表达 TFDP3 后,上皮细胞标记分子 E-cadherin 表达下调,而间质细胞标记分子 N-cadherin、Snail、Twist 及细胞骨架蛋白 Vimentin 表达上调。**结论:**TFDP3 可以促进乳腺癌细胞发生 EMT。

关键词:癌-睾丸抗原;TFDP3;乳腺癌;上皮间质化**中图分类号:**R730.231;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-01-03

Correlation Studies on Cancer-testis Antigen TFDP3 and Epithelial-mesenchymal Transition in Breast Cancer*

XIAO Peng^{1#}, CHU Ming^{1#}, SUN Ze-wen¹, DU Yi-cong¹, ZHANG Ming-bo², XU Lan¹, CHU Zheng-yun², CHEN Xue¹,
HE Jia-xie¹, DING Ling-yu¹, JIAO Yun-shen¹, WANG Yue-dan^{1△}

(1 Department of Immunology Peking University Health Science Center, Beijing, 100191, China;

2 Department of Pharmaceutical Sciences Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between cancer testis antigen TFDP3 and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer. **Methods:** In this study, the breast cancer cell lines (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231) were analyzed by Western Blot to obtain a TFDP3 positive strain with lower expression. Then, we established a TFDP3 over-expression cell line by plasmid transfection, and observed the role of TFDP3 in EMT. **Results:** TFDP3 was not detected in MCF-10A and SK-BR-3, but at a relatively high level in MDA-MB-231 which exhibited as a mesenchymal cell line, and at a low level in MCF-7 which retains epithelial characteristics. Once MCF-7 over-expressed TFDP3, the epithelial cell marker E-cadherin was down-regulated, and the mesenchymal cell markers were up-regulated, including N-cadherin, Snail, Twist and cytoskeletal proteins Vimentin. **Conclusion:** TFDP3 might play an important role in promoting EMT in breast cancer cells.

Key words: Cancer testis antigen; TFDP3; Breast cancer; EMT**Chinese Library Classification(CLC):** R730.231; R737.9 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2015)01-01-03

前言

癌-睾丸抗原(cancer testis antigen, CTA)是一类特异性表达在睾丸以及肿瘤组织中的肿瘤相关抗原。目前已发现 96 个 CTA,分别由 15 个基因家族和 31 种基因编码。TFDP3 是广泛表达在多种肿瘤组织中的一种 CTA,与 TFDP1 的氨基酸序列

高度同源,主要通过竞争性结合 E2F1 来抑制细胞周期的进程,同时也参与 E2F1 通过 P53 介导的细胞凋亡^[1-3]。乳腺癌是 CTA 表达相当广泛的一类恶性肿瘤,多数 CTA 的表达与患者病情的恶化及不良预后相关,如 MAGE-A3、NY-ESO-1 等,且乳腺癌病人在病情的中晚期常出现淋巴结转移甚至远处转移,这些都可能与癌-睾丸抗原的表达及其功能相关^[4]。乳腺癌的发生

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172884);国家基础科学人才培养基金(J1030831/J0108);

北京大学创新人才培养计划,北京大学医学部新教师启动基金项目(BMU0239)

共同第一作者

作者简介:肖鹏(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤免疫

初明(1984-),男,讲师,主要研究方向:肿瘤免疫,抗感染免疫

△ 通讯作者:王月丹, E-mail: wangyuedan@bjmu.edu.cn

(收稿日期:2014-06-21 接受日期:2014-07-16)

发展及转移多与上皮间质转化(EMT)密切相关^[5]。EMT 既可以促进肿瘤细胞的浸润以及转移,还可以使肿瘤细胞逃逸某些因素诱导的细胞凋亡。本研究主要探讨了 TFDP3 在乳腺癌发生 EMT 过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、SK-BR-3、MCF-10A 及 MCF-7 均购自美国标准生物品收藏中心(ATCC)。各细胞系均常规培养在合适的培养环境中:MDA-MB-231 及 MCF-7 的培养基为含 10% 灭活胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM,SK-BR-3 的培养基为含 10% 灭活胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 g·mL⁻¹ 链霉素的 1640,MCF-10A 的培养基为含 5% 马血清、表皮生长因子 20 ng·mL⁻¹、氢化可的松 0.5 g·mL⁻¹、霍乱毒素 100 ng·mL⁻¹、胰岛素 10 μg·mL⁻¹ 的 DMEM/F12(1:1),置于饱和适度,二氧化碳浓度 5% 的 37℃ 恒温孵箱中。

1.2 脂质体转染质粒

将细胞调整到合适密度(约 $2.0-3.0 \times 10^5$)铺在六孔板中,铺板 24 小时后进行转染。同时转染 GFP 质粒来检测转染效率。将稀释好的 TFDP3、空白对照质粒及 GFP 质粒分别与脂质体混匀,室温下静置 20 分钟后,加入到细胞中。转染 48 小时后

收取转染有 GFP 质粒的细胞,利用流式细胞仪来检测转染效率。

1.3 Western blot 检测目的蛋白表达情况

转染 48 小时后收转染 TFDP3 及空白质粒组细胞。经裂解液裂解后,取 BCA 法定量为 50 g 的蛋白样品上样于 12% 的 SDS-PAGE 凝胶,恒压电泳后将蛋白恒流转于 PVDF 膜上。封闭完毕后,将 PVDF 膜置于稀释比例为 1:200 的 TFDP3 抗体中 4℃ 孵育过夜,经 TBST 洗涤后,将膜置于稀释比例为 1:10000 的 licor- 荧光二抗中室温孵育 1 小时,经 TBST 洗涤后,利用 Odyssey 红外系统凝胶成像仪扫描蛋白印迹。已扫描过 TFDP3 的 PVDF 膜以同样的步骤经洗涤后孵育 β-actin(稀释比例为 1:1000)并成像。

1.4 总 RNA 提取,逆转录及 Realtime PCR 检测

转染 24 小时后,利用 TRIzol 试剂收取细胞并抽提总 RNA,经定量测定其浓度及纯度后,对总 RNA 中的 mRNA 进行逆转录,得到 cDNA。利用 Realtime PCR 检测对照组及转染 TFDP3 质粒组细胞里 E-cadherin、N-cadherin、Snail、Twist 及 Vimentin 等基因的表达情况,以 β-actin 为内参。Realtime PCR 反应体系为 20 L,反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共扩增 40 个循环。定量方法选择为相对定量,数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析。每组实验重复三遍。实验中使用的引物序列见表 1^[6]。

表 1 Realtime PCR 引物序列信息
Table 1 Primers used for Realtime PCR

Gene	Sequence (5' to 3')	Product Size (base pairs)
E-cadherin	Forward: CCCACCACGTACAAGGGTC	94bp
	Reverse: CTGGGGTATTGGGGGCATC	
N-cadherin	Forward: CAACTTGCCAGAAACTCCAGG	215bp
	Reverse: ATGAAACCGGGCTATCTGCTC	
Snail	Forward: AATCGGAAGCCTAACTACAGCG	157bp
	Reverse: GTCCCAGATGAGCATTGGCA	
Twist	Forward: GTCCGCAGTCTTACGAGGAG	156bp
	Reverse: GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT	
Vimentin	Forward: CGCCAGATGCGTGAATGG	278bp
	Reverse: ACCAGAGGGAGTGAATCCAGA	
β-actin	Forward: CTCATCCTGGCCTCGCTGT	250bp
	Reverse: GCTGTCACCTTACCGTTCC	

2 结果

2.1 乳腺癌细胞系 TFDP3 的表达情况

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MCF-7 中均有一定程度的 TFDP3 的表达,且 MDA-MB-231 中表达量相对 MCF-7 中较高,而乳腺癌细胞系 SK-BR-3 及正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A 均不表达 TFDP3(图 1)。

2.2 TFDP3 促进乳腺癌细胞 MCF-7 发生 EMT

通过脂质体转染的方法,在 MCF-7 细胞中转染 GFP 质粒 48 小时后,经流式仪检测发现,MCF-7 的转染效率可以达到 83.8%(图 2.a)。进一步,我们构建了 TFDP3 的质粒,并通过转染的方法在 MCF-7 中过表达 TFDP3,结果发现,经过质粒转染后的 MCF-7 高水平表达 TFDP3 蛋白(图 2.b)。在此基础上,我

们通过 Realtime PCR 的方法,检测了几种在上皮细胞发生 EMT 过程中的分子标记物,结果表明,上皮标记物分子 E-cadherin 出现表达下调,间质标记物分子 N-cadherin、Snail、Twist 及细胞骨架蛋白 Vimentin 表达上调,提示过表达 TFDP3 的 MCF-7 发生了 EMT(图 3.a 和 3.b)。

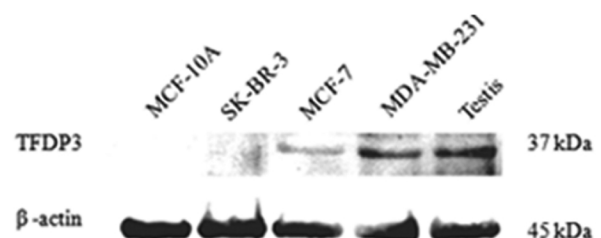


图 1 TFDP3 在细胞系及睾丸组织中的表达情况

Fig.1 Expression of TFDP3 in cancer cells and testis tissue

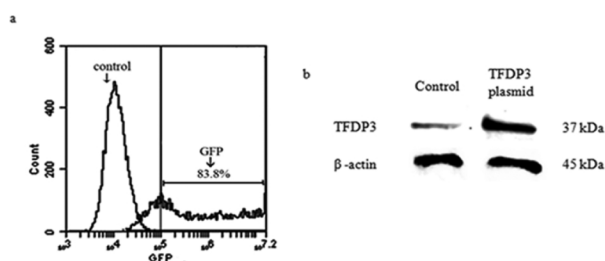


图2 TFDP3 过表达模型的构建

Fig. 2 The establishing of TFDP3 over-expression model and the expression of EMT marker genes

注:(a)GFP 的转染效率 (b) Western blot 分析对照组及模型组中 TFDP3 表达 β-actin 为内参。

Note: (a) Transfection efficiency of GFP plasmid. (b) Western blot analysis of TFDP3 in control group and model group. β-actin was analyzed for normalization.

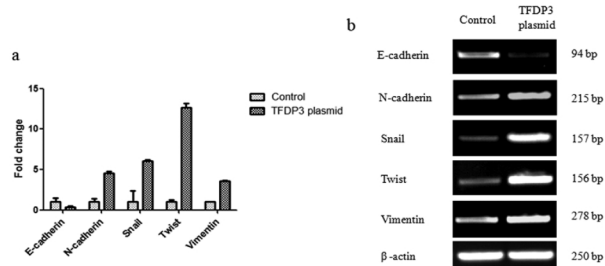


图3 MCF-7 过表达 TFDP3 后 EMT 分子标记物的表达 Realtime PCR (a) 和半定量 PCR (b) 方法检测 MCF-7 细胞过表达 TFDP3 后 EMT 相关分子标记物的表达变化 β-actin 扩增为内参基因扩增。误差线取自三次独立实验的标准差

Fig.3 MCF-7 cells were transduced with a plasmid over-expressing TFDP3 and expression of EMT marker genes was measured by quantitative PCR (a) or semiquantitative RT-PCR (b). β-actin was amplified for normalization. Error bars represent the SD from three independent experiments

3 讨论

乳腺癌中 CTA 表达种类比较广泛,80%以上的乳腺癌标本中都表达至少一种 CTA,超过半数表达两种甚至多种。乳腺癌中 CTA 的表达情况与乳腺癌的恶性程度及预后密切相关。研究发现,MAGE 家族及 NY-ESO-1 的表达可能与乳腺癌的分子分型相关,如三阴性乳腺癌肿瘤组织多表达 NY-ESO-1,其预后较差,且生存期较短^[7]。TFDP3 在正常组织中仅在胰腺及睾丸组织中有表达,在肿瘤组织中的表达多集中在原发性肝癌及前列腺癌等,有研究表明 TFDP3 在乳腺癌中也有一定表达^[8]。本研究选取了几种常见乳腺癌细胞系来筛选出表达 TFDP3 的细胞系,发现在细胞系 MDA-MB-231 及 MCF-7 中 TFDP3 有表达,且表达量不一。TFDP3 在 MDA-MB-231 中的表达明显高于 MCF-7,而 MDA-MB-231 间质特性明显,侵袭性强,MCF-7 上皮特性明显,侵袭性弱,这提示 TFDP3 与 EMT 可能存在相关性。目前对于 TFDP3 的研究基本集中在细胞增殖及凋亡方面,TFDP3 阻断周期进程及抑制 E2F1 诱导 P53 通路诱导的凋亡主要是通过竞争性结合 E2F1 实现。同时又有研究表明,在转移性肿瘤中,多数样本中有 E2F1 的表达上调,而 E2F1 的上调

同时也会使 TFDP3 出现表达上调,因此 E2F1 与 TFDP3 的高表达均可能与肿瘤转移相关^[8]。

肿瘤转移是一个集合局部形成肿瘤微环境,肿瘤细胞获得强侵袭力并异位定植进而恶性增殖的复杂过程,而 EMT 在肿瘤转移过程中起着重要作用。EMT 程序多由 TGF-β、经典及非经典 Wnt 三条信号通路协同作用诱导激活,之后以自分泌的方式维持最终的间质细胞状态^[9,10]。E-cadherin,属 I 型钙粘素家族,其跨膜结构的胞外段之间相互形成连接,胞内段与肌动蛋白相连,使细胞间形成稳定接触,对上皮表型的维持很重要^[11]。EMT 过程中的多条通路最终都可通过下调 E-cadherin 来使上皮细胞逐渐失去其固有的上皮特征,随之而来的钙黏连蛋白转换诱导 N-cadherin 等非上皮性钙粘蛋白产生则增强了乳腺癌的侵袭转移能力。同时 E-钙粘蛋白的缺失还可激活 Wnt 信号通路及其他 EMT 相关通路,通过反馈促进 EMT 的发展^[12]。作为间质细胞的一种重要标记物,Vimentin 在维持间质特征中发挥重要作用,Vimentin 的上调表达是 EMT 晚期的重要事件^[13]。本研究中选择使用 Realtime PCR 方法检测的分子标记物中,E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 分别在上皮及间质标记方面提示过表达 TFDP3 的 MCF-7 细胞可能发生了 EMT,而 Twist、Snail 等 EMT 相关转录因子的上调也在其他研究中被证实会促进肿瘤细胞上皮性标记物下调及间质表型的获得,并导致较差临床预后^[14-17],如 Snail 上调与乳腺浸润性导管癌低分化、淋巴结转移相关,而 Twist 高表达多发生在侵袭性小叶癌。本研究中探讨了 TFDP3 高表达对 EMT 的发生发展有促进作用,提示 TFDP3 在促进肿瘤转移方面有着潜在功能。

参考文献(References)

- [1] Wang Y, Han KJ, Pang XW, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma associated antigens by autoantibodies [J]. J Immunol, 2002, 169(2): 1102-1109
- [2] Tian C, Lv D, Qiao H, et al. TFDP3 inhibits E2F1 induced, p53 mediated apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 20-25
- [3] Ma Yue-yun, Xin Yi-juan, Li Rui, et al. TFDP3 was expressed in coordination with E2F1 to inhibit E2F1-mediated apoptosis in prostate cancer[J]. Gene, 2014, 537(2): 253-259
- [4] Daniela Bandić, Antonio Juretić, Božena Šaržević, et al. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study[J]. Croat Med J, 2006, 47(1): 32-41
- [5] Raghu Kalluri. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells[J]. J. Clin. Invest, 2009, 119(6): 1417-1419
- [6] Joseph H.Taube, Jasan I.Herschkowitz, Kakajan Komurov, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes [J]. PNAS, 2010, 107(35): 15449-15454
- [7] G Curigliano, G. Viale, M. Ghioni, A. A. Jungbluth et al. Cancer-testis antigen expression in triple-negative breast cancer[J]. Annals of Oncology, 2011, 22(1): 98-103
- [8] Ma Yue-yun, Xin Yi-juan, Li Rui, et al. TFDP3 was expressed in coordination with E2F1 to inhibit E2F1-mediated apoptosis in prostate cancer[J]. Gene, 2014, 537(2): 253-259

(下转第 8 页)

- Immunol, 2011, 30(2): 720-728
- [9] Hu YH, Wang HL, Zhang M, et al. Molecular analysis of the copper-responsive CopRSCD of a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain[J]. J Microbiol, 2009, 47(3): 277-286
- [10] Miller VL, JJ Mekalanos. A Novel Suicide Vector and Its Use in Construction of Insertion Mutations - Osmoregulation of Outer-Membrane Proteins and Virulence Determinants in *Vibrio-Cholerae* Requires ToxR[J]. J Bacteriol, 1988, 170(6): 2575-2583
- [11] Hu YH, WJ Zheng, L Sun. Identification and molecular analysis of a ferritin subunit from red drum (*Sciaenops ocellatus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(4): 678-686
- [12] Jiao XD, Cheng S, Hu YH, et al. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen [J]. Vaccine, 2010, 28(7): 1832-1837
- [13] Sun Y, CS Liu, L Sun. Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding a D15-like surface antigen[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(1): 273-279
- [14] Hu YH, W Dang, L Sun. A TonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens*: virulence and vaccine potential[J]. Arch Microbiol, 2012, 194(9): 795-802
- [15] Lim CK, Hassan KA, Tetu SG, et al. The Effect of Iron Limitation on the Transcriptome and Proteome of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5[J]. Plos One, 2012, 7(6): e39139
- [16] Li N, Zhang J, Zhang LQ, et al. Difference in genes between a high virulence strain G (4) and a low virulence strain G (18) of *Flavobacterium columnare* by using suppression subtractive hybridization[J]. J Fish Dis, 2010, 33(5): 403-412
- [17] Brickman TJ, SK Armstrong. Impact of alcaligin siderophore utilization on in vivo growth of *Bordetella pertussis*[J]. Infect Immun, 2007, 75(11): 5305-5312
- [18] Hu QH, Ding C, Tu J, et al. Immunoproteomics analysis of whole cell bacterial proteins of *Riemerella anatipestifer*[J]. Vet Microbiol, 2012, 157(3-4): 428-438
- [19] Leduc I, Fusco WG, Choudhary N, et al. Passive Immunization with a Polyclonal Antiserum to the Hemoglobin Receptor of *Haemophilus ducreyi* Confers Protection against a Homologous Challenge in the Experimental Swine Model of Chancroid [J]. Infect Immun, 2011, 79(8): 3168-3177

(上接第 3 页)

- [9] Jian Xu, Samy Lamouille, Rik Derynck, et al. TGF- α -induced epithelial to mesenchymal transition [J]. Cell Research, 2009, 19 (2): 156-172
- [10] Raghu Kalluri, Robert A. Weinberg, et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428
- [11] Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 384(1): 6-11
- [12] Tamer T. Onder, Piyush B. Gupta, Sendurai A. Mani, et al. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3645-3654
- [13] K Vuoriluoto, H Haugen, S Kiviluoto, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer [J]. Oncogene, 2011, 30 (12): 1436-1448
- [14] A Marc J. van de Vijver, Yudong D. He, Laura J. van 't Veer, et al. Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer[J]. N Engl J Med, 2002, 347(25): 1999-2009
- [15] Tracey A. Martin, Amit Goyal, Gareth Watkins, et al. Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2005, 12(6): 488-496
- [16] Kang Y, Massagué J. Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3):277-279
- [17] Núria Montserrat, Alberto Gallardo, Daniel Escuin, et al. Repression of E-cadherin by SNAIL, ZEB1, and TWIST in invasive ductal carcinomas of the breast: a cooperative effort?[J]. Human Pathology, 2011, 42(1): 103-110