

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00476

皮质肌动蛋白在不同转移潜能乳腺癌细胞中的表达及意义

张俊¹, 曹辉¹, 郭启帅¹, 张涛², 汤为学³, 李少林^{1*}

- 1. 重庆医科大学放射医学教研室, 重庆 400016
- 2. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016
- 3. 重庆医科大学附属第一医院实验中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 筛选不同转移潜能的乳腺癌细胞亚系, 并探讨皮质肌动蛋白(cortactin)在乳腺癌细胞增殖和侵袭过程中的作用。**方法** 经过连续人工基质膜侵袭实验后获得高、低转移潜能的乳腺癌细胞亚系, 通过透射电镜观察比较两系细胞的超微结构, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测两系细胞增殖能力, 流式细胞仪检测两系细胞周期, Transwell 侵袭小室模型比较两系的迁移能力。应用免疫细胞化学法、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质印迹分析法检测 cortactin 蛋白在两系细胞中的表达。**结果** 利用人工基质膜侵袭实验筛选出高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系, 并且两系细胞形态上无明显差异。MTT 实验显示高转移潜能细胞体外生长速度显著快于低转移潜能细胞($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示, 高转移潜能细胞亚系与低转移潜能细胞亚系相比, G_0/G_1 期细胞前者比后者少 $[(52.67 \pm 3.69)\% \text{ vs } (64.46 \pm 2.79)\%]$, 而 S 期细胞前者比后者多 $[(30.53 \pm 6.19)\% \text{ vs } (24.63 \pm 2.04)\%]$ 。高转移潜能细胞亚系增殖指数(PI)高于低转移细胞亚系 $[(47.32 \pm 3.69)\% \text{ vs } (35.53 \pm 2.80)\%, P < 0.05]$, 侵袭能力显著强于低转移潜能细胞亚系 $[(61.46 \pm 7.08) \text{ vs } (25.32 \pm 4.87) \text{ 个/视野}, P < 0.05]$ 。免疫组化、RT-PCR 和蛋白质印迹分析均显示在高转移潜能细胞亚系中 cortactin 在基因和蛋白水平的表达均高于低转移潜能细胞亚系($P < 0.05$)。**结论** Cortactin 的过表达与乳腺癌的增殖和转移过程密切相关。

[关键词] 乳腺肿瘤; 皮质肌动蛋白; 肿瘤转移; 细胞增殖

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0476-05

Expression of cortactin in human breast cancer cell lines with different metastasis potentials

ZHANG Jun¹, CAO Hui¹, GUO Qi-shuai¹, ZHANG Tao², TANG Wei-xue³, LI Shao-lin^{1*}

- 1. Department of Radiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
- 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
- 3. Department of Laboratory Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To screen for human breast cancer sub-cell lines with different metastasis potentials, and to investigate the role of cortactin in proliferation and metastasis of human breast cancer cells. **Methods** Human breast cancer sub-cell lines with different metastasis potentials were screened by continuous *in vitro* invasion assays. Ultra-microstructures of sub-cell lines were observed under transmission electron microscope. The proliferation of sub-cell lines was detected by MTT; the cell cycle was observed by flow cytometry; and the migration ability of sub-cell lines was observed by Transwell assay. The mRNA and protein expression of cortactin was examined by immunofluorescence, RT-PCR and Western blotting assay. **Results** Two sub-cell lines with different potentials of metastasis were obtained through continuous *in vitro* invasion assay, and they showed essentially identical morphology under the transmission electron microscope. The MTT results showed that proliferation of high metastasis cells was faster than that of low metastasis cells ($P < 0.05$). Flow cytometry demonstrated that the proportion of high metastasis cells in G_0/G_1 phase was less ($[52.67 \pm 3.69]\% \text{ vs } [64.46 \pm 2.79]\%$), and that in S phase was more than that of low metastasis cells ($[30.53 \pm 6.19]\% \text{ vs } [24.63 \pm 2.04]\%$). The proliferation index (PI) of high metastasis cells was higher than that of low metastasis cells ($[47.32 \pm 3.69]\% \text{ vs } [35.53 \pm 2.80]\%, P < 0.05$). Compared with low metastasis cells, the number of high metastasis cells passing through the membrane was significantly more ($[61.46 \pm 7.08] \text{ vs } [25.32 \pm 4.87] \text{ cells/field}, P < 0.05$). The expression levels of mRNA and protein of cortactin in high metastasis cells

[收稿日期] 2009-11-23 **[接受日期]** 2010-01-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30570523), 重庆市卫生局医学科研项目(07-2-082). Supported by National Natural Science Foundation of China (30570523) and Medical Research Fund by Chongqing Bureau of Public Health (07-2-082).

[作者简介] 张俊, 博士生. E-mail: coldage2010@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68485060, E-mail: Shaolinli202@sina.com

was higher than that in low metastasis cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Over-expression of cortactin is closely related to the proliferation and metastasis of human breast cancer cells.

[Key words] breast neoplasms; cortactin; neoplasm metastasis; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):476-480]

乳腺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,且其发病率呈增长趋势^[1]。其侵袭转移和术后复发是导致患者病死的主要原因。最新的研究表明,特异定位于细胞皮质的皮质肌动蛋白(cortactin)作为联系细胞外的信号分子和细胞骨架的桥梁,既参与细胞的生长和信号转导,又可接受胞外信号,使骨架蛋白重新分布,调节细胞运动能力,是促进肿瘤侵袭和转移的分子机制之一^[2-3]。本实验利用细胞穿透人工基质膜能力的差异来筛选具有不同转移潜能的乳腺癌细胞亚系,并通过免疫组化、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹分析等方法探讨 cortactin 在人乳腺癌细胞增殖和侵袭中的作用,为乳腺癌转移机制的研究奠定一定的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s、小鼠成纤维细胞系(NIH3T3 细胞),中国科学院细胞库。Transwell 小室(Milipore PI8P01250,美国 Costar 公司,聚碳酸酯微孔膜孔径 8 μm)。Matrigel 重组人工基质胶(美国 BD 公司),免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。细胞总 RNA 提取和 RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。Cortactin 兔抗人多克隆抗体(美国 GenScript 公司), β -actin(北京博奥森生物技术有限公司),化学发光试剂(上海闪晶分子生物科技有限公司)。

1.2 含趋化因子的条件培养液的制备 对数生长期的 NIH3T3 细胞传代培养至 80% 融合, PBS 洗涤 3 次,加入 3 ml 无血清 RPMI 1640 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 24 h。收集培养液,离心(500 $\times g$, 15 min),取上清,过滤除菌后分装于 2 ml 的冻存管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 人高转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立 将 10 mg/ml 的 Matrigel 胶与 RPMI 1640 培养液以 1:5 的比例混合成 60 μl 溶液,均匀平铺于 Transwell 小室的聚碳酸酯微孔膜上制备成人工基底膜。取 MDA-MB-435s 的细胞悬液 400 μl (细胞数 2×10^5 个)接种到 Transwell 小室内,将小室放入 24 孔板,24 孔板内加入 600 μl 含趋化因子的条件培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后观察,此时仅少量

细胞穿过人工基底膜贴壁于 24 孔板上,将此细胞常规培养至传代,即为高转移潜能细胞;将 Transwell 小室移至另一孔内,下室同样加 600 μl 的条件培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后进行观察及换液。如此再重复 11 次后(即 288 h 后),收集上室细胞扩大培养,即为低转移潜能细胞。

1.4 透射电镜观察超微结构 取对数生长期的高、低转移潜能乳腺癌细胞各 1 瓶(细胞数 1×10^6 个),用 0.1% 胰酶消化洗脱细胞,移入离心管中,离心(400 $\times g$, 15 min),弃上清,轻轻加入预冷的 4% 戊二醛中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h,将固定液换成 0.1 mol/L PBS。细胞团经 2% 锇酸后固定 2 h、乙醇梯度脱水、环氧树脂浸透、包埋、超薄切片(片厚 50 nm)、铀-铅复染后,在 JEM-2000EX 型电镜(日本 JEOL 公司)下观察。

1.5 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖 将高、低转移潜能乳腺癌细胞分别接种于 96 孔板,接种密度为 1×10^4 /孔,总体积均为 200 μl 。每天各选取 1 块 96 孔板进行 MTT 反应,测 570 nm 光密度(D)值,每个时间点设 4 个复孔,连续测定 7 d。根据光密度值绘制生长曲线,比较两系细胞生长速度的变化。

1.6 流式细胞术检测细胞周期分布 对数生长期的高、低转移潜能乳腺癌细胞传代培养至 80% 融合,然后在无血清培养液条件下培养 48 h,以使细胞大部分阻滞于 G_0/G_1 ;然后给予含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 12 h;培养结束后,0.1% 胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,以 75% 乙醇固定。使用流式细胞仪(Becton Dickson)检测并用软件分析各组细胞的周期分布,根据细胞周期中处于 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期细胞的构成比,计算出细胞增殖指数(proliferating index, PI)。 $PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测细胞的运动侵袭能力 采用带 Transwell 微孔膜的 24 孔培养板(美国 Millipore 公司),在 24 孔板内加入含趋化因子的条件培养液 600 μl ,小室内分别加入含 2×10^5 个高、低转移潜能乳腺癌细胞的 10% RPMI 1640 培养液 400 μl ,各重复 3 个小室。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。取出小室,将上室细胞用棉签轻轻擦干净, PBS 洗 3

次后,用95%乙醇固定10 min,将Transwell微孔膜H-E染色,取下小室微孔膜反转贴于载玻片上,中性树脂胶封片。随机选择10个200倍显微视野,计数由小室迁移至微孔膜下的细胞数量,求得单个视野的平均穿膜细胞数。

1.8 免疫组化 在24孔板底放置预先处理过的盖玻片,取对数生长期的高、低转移潜能乳腺癌细胞接种培养,制备细胞爬片,用S-P9000法染色,DAB显色,苏木精对比染色,脱水透明,中性树脂胶封片。Cortactin的一抗稀释浓度为50 μg/ml,用PBS代替一抗作为阴性对照。以细胞周边有明显黄棕色颗粒沉积为阳性表达,在200倍镜下选定具有代表性的24个视野,照相并测定其D值进行计算。

1.9 RT-PCR检测cortactin mRNA表达 按照RNA提取试剂盒及RT-PCR试剂盒说明书操作,提取RNA并进行反转录反应。Cortactin的引物序列为:5'-TGA GTG TGT GTT CTT CCC CAA G-3'(上游),5'-CAC GTG ACC TTC TGG AAA GAC A-3'(下游),扩增产物为170 bp。以β-actin为内参照,扩增产物为285 bp,引物序列为:5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3'(上游),5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'(下游)。PCR条件:94℃ 2 min,94℃ 30 s;60℃ 30 s;72℃ 1 min(循环35次)。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果通过凝胶成像系统进行分析。

1.10 蛋白质印迹分析检测细胞cortactin蛋白表达 收集对数生长期的高、低转移潜能乳腺癌细胞,以SDS蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白并测其浓度,保存于-20℃备用。每个样品取100 μg蛋白质加入等体积的上样缓冲液,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(4%浓缩胶,10%分离胶)后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,以10%脱脂奶粉封闭1 h,加入1:1 000稀释的cortactin和β-actin一抗孵育过夜。TBST洗膜后加入1:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(碧云天生物技术研究),温育孵育2 h,再经化学发光,显影,定影后分析。

1.11 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行t检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人高转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立 人工

基质膜侵袭实验24 h后,可见仅少量细胞穿过人工基底膜进入下室,此时收集下室细胞作为高转移潜能乳腺癌细胞。288 h后,大部分细胞穿过人工基底膜进入下室,此时收集上室细胞作为低转移潜能乳腺癌细胞。高、低转移潜能乳腺癌细胞在透射电镜下比较,两者形态上无明显差异,但高转移潜能细胞表面可见较多微绒毛或伪足,核质比大,病理性核分裂象较多(图1)。

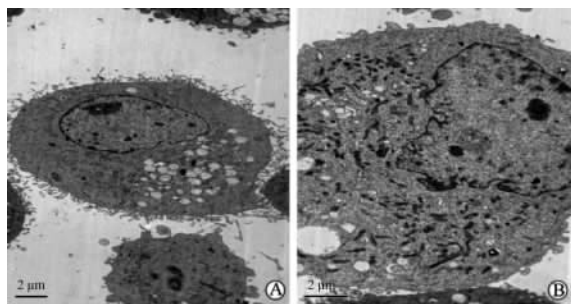


图1 高、低转移潜能乳腺癌细胞的超微结构
Fig 1 Ultra-microstructure of breast cancer cells with high and low metastasis potentials

A: High metastasis potential cells; B: Low metastasis potential cells

2.2 MTT法测定高、低转移潜能乳腺癌细胞的增殖情况 根据连续7 d测定的高、低转移潜能乳腺癌细胞的D值,绘制生长曲线,见图2。结果显示:高转移潜能乳腺癌细胞体外生长速度显著快于低转移潜能乳腺癌细胞,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

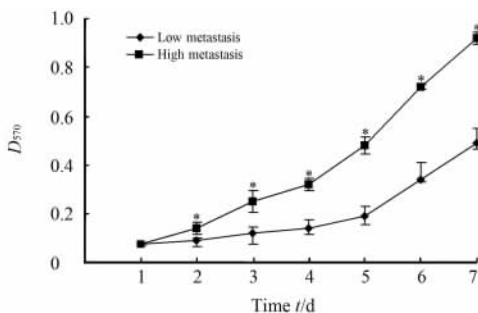


图2 高、低转移潜能乳腺癌细胞亚体系体外生长曲线
Fig 2 Growth curve of breast cancer cells with high and low metastasis potentials

* $P < 0.05$ vs low metastasis potential cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 细胞周期分析 流式细胞术检测结果显示,高转移乳腺癌细胞亚系的G₀/G₁期(52.67 ± 3.69)%,S期(30.53 ± 6.19)%;低转移潜能乳腺癌细胞亚系的G₀/G₁期(64.46 ± 2.79)%,S期(24.63 ± 2.04)%。G₀/G₁期前者比后者少,而S期前者比后者多。根据PI公式得出高、低转移乳腺癌细胞亚系PI分别为

(47.32 ± 3.69)% 和 (35.53 ± 2.80)%, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明高转移潜能乳腺癌细胞

亚系体外生长速度快于低转移潜能乳腺癌细胞亚系 (图3)。

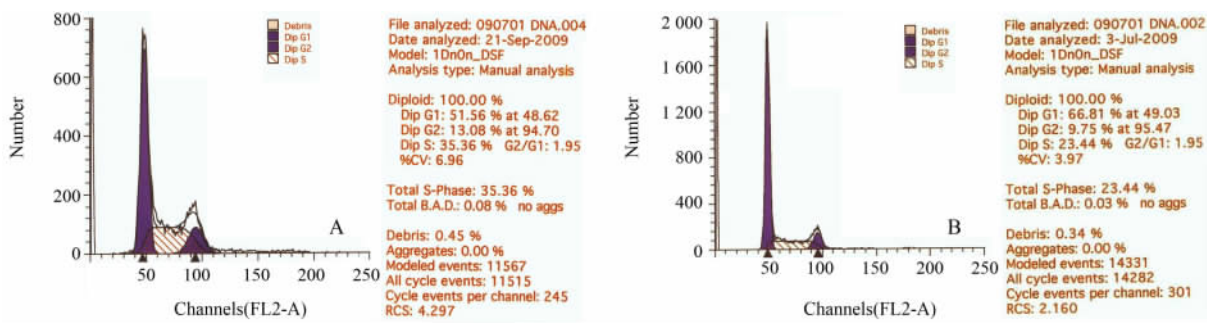


图3 流式细胞术分析高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系细胞周期

Fig 3 Cell cycle of breast cancer cells with high and low metastasis potentials was detected by flow cytometry

A: High metastasis potential cells; B: Low metastasis potential cells

2.4 Transwell实验检测细胞的运动侵袭能力 结果显示高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系穿透数量分别为(61.46 ± 7.08)和(25.32 ± 4.87)个/视野, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明高转移潜能乳腺癌细胞亚系侵袭能力强于低转移潜能乳腺癌细胞亚系 (图4)。

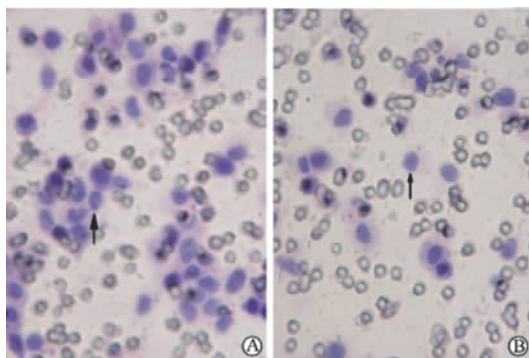


图4 Transwell 实验检测细胞的运动侵袭能力

Fig 4 Transwell test for migration ability of cells(H-E)

A: High metastasis potential cells; B: Low metastasis potential cells; ↑: Invasion of tumor cells. Original magnification: $\times 200$

2.5 Cortactin 在高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系中的表达 免疫细胞化学结果显示, 大部分乳腺癌细胞呈阳性反应, 阳性反应产物为有黄棕色颗粒沉积。高、低转移潜能乳腺癌细胞的平均 D 值分别为 0.66 ± 0.02 和 0.32 ± 0.01 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 cortactin 在高转移乳腺癌细胞亚系的表达高于低转移潜能乳腺癌细胞亚系 (图5)。

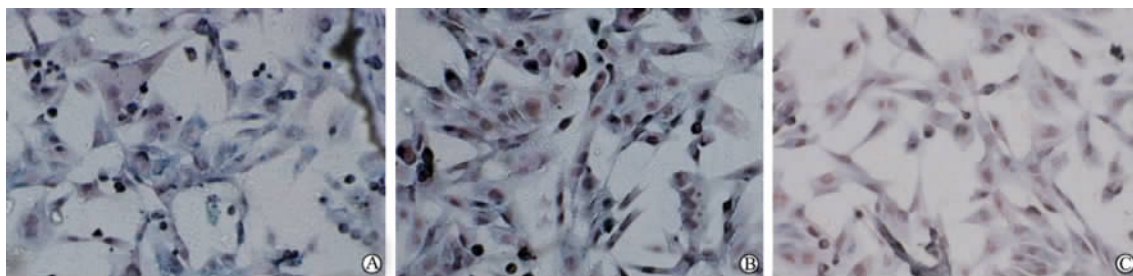


图5 Cortactin 在高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系中的表达

Fig 5 Expression level of cortactin in breast cancer cells with high and low metastasis potentials (SP)

A: High metastasis potential cells; B: Low metastasis potential cells; C: Negative control group. Original magnification: $\times 200$

2.6 RT-PCR 检测结果分析 Cortactin 在高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系中表达的平均 D 值分别为 0.73 ± 0.08 和 0.50 ± 0.04 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 cortactin mRNA 在高转移潜能乳腺癌细胞中表达明显高于低转移潜能乳腺癌细胞 (图6)。

2.7 蛋白质印迹分析结果 Cortactin 蛋白在高、低转移潜能乳腺癌细胞中表达的平均 D 值分别为 0.72 ± 0.03 和 0.33 ± 0.02 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 cortactin 蛋白在高转移乳腺癌细胞亚系的表达明显高于低转移潜能乳腺癌细胞亚系 (图7)。

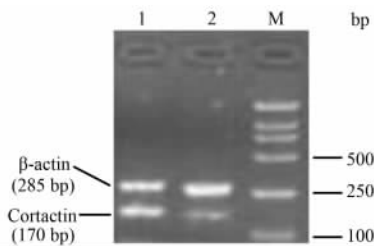


图6 Cortactin mRNA 在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达

Fig 6 Expression level of cortactin mRNA

in breast cancer cells with high and low metastasis potentials

1: High metastasis potential cells; 2: Low metastasis potential cells; M: Marker

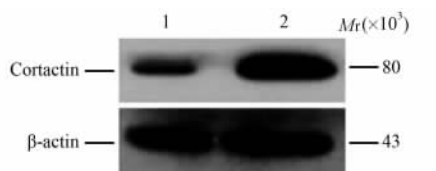


图7 Cortactin 蛋白在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达

Fig 7 Expression level of cortactin protein

in cells with high and low metastasis potentials

1: Low metastasis potential cells; 2: High metastasis potential cells

3 讨论

肿瘤异质性理论认为,来源于同一肿瘤组织中的不同肿瘤细胞亚群,由于自身遗传的不稳定性和体内外环境的选择压力,其生物学特性会出现不断变化,导致其表型的多样化差异。而肿瘤发生发展的一个显著特征是肿瘤细胞异质性的不断产生,在转移性状方面主要表现为在一个肿瘤细胞系中存在不同转移潜能的细胞亚群。因此可以推测,人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s 中存在有不同转移潜能的细胞亚群。基于这一理论,应用侵袭实验对细胞系进行筛选是可行的^[4-5]。本实验利用人乳腺癌细胞穿透人工基质膜能力的差异来筛选高、低转移潜能细胞亚系,建立了具有稳定转移表型的乳腺癌细胞亚系,简化了实验过程,克服了选择扩增时的盲目性,这为进一步研究肿瘤转移的机制奠定了基础。

1993年,Schuuring等^[6]在人类乳腺癌细胞中克隆了一个位于11q13的新的癌基因,即EMS1,又名CTTN。由于其表达产物具有与F-actin结合的能力,而且主要分布在细胞周边,能与肌动蛋白结合进而影响细胞骨架的功能,因此将它命名为细胞皮质肌动蛋白(cortactin)^[7]。在头颈部肿瘤及乳腺癌中都有该蛋白过表达,并且与肿瘤的转移和不良预后相关。有研究表明cortactin主要是调节细胞运动能力而影响肿瘤的侵袭力^[8]。大约15%乳

腺癌患者存在11q13扩增,该区域内的2个基因cortactin和cyclin D1的变化最引人注目。其中,cortactin在乳腺癌中发生扩增的频率达到15.2%,并且cortactin扩增能够单独存在,而不依赖于其他基因的变化^[9]。在乳腺癌中还发现cortactin高表达,而且依据患者年龄、肿瘤大小差异、是否转移和复发等临床病理特征表达强度也有变化,提示cortactin与乳腺癌患者预后可能也有一定的联系^[10]。

本实验结果提示,cortactin也是乳腺癌生长侵袭过程中的重要分子,cortactin蛋白可以作为一个新的指标来判定乳腺癌细胞的转移能力。但是目前对cortactin在肿瘤中侵袭转移过程的作用机制还不是很清楚,还需要进行进一步更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Yu K D, Di G H, Wu J, Lu J S, Shen K W, Shen Z Z, et al. Development and trends of surgical modalities for breast cancer in china: a review of 16-year data [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14: 2502-2509.
- [2] Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775: 263-273.
- [3] Weaver A M. Cortactin in tumor invasiveness [J]. *Cancer Lett*, 2008, 265: 157-166.
- [4] Bai F, Guo X, Yang L, Wang J, Shi Y, Zhang F, et al. Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell implantation [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52: 1571-1578.
- [5] 谭晓洁, 侯建国, 贺松琴, 陈北川, 曹广文. 采用体外侵袭实验分离侵袭性人原代肾细胞癌细胞 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 318-321.
- [6] Tan X J, Hou J G, He S Q, Chen B C, Cao G W. Separation of invasive subpopulation from primary human renal cell carcinoma *via in vitro* invasion assay [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 318-321.
- [7] Schuuring E, Verhoeven E, Litvinov S, Michalides R J. The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a vsrc substrate and is located in cell-substratum contact sites [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 2891-2898.
- [8] Wu H, Parsons J T. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex [J]. *J Cell Biol*, 1993, 120: 1417-1426.
- [9] Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild C C, Kaczmarek M, et al. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 6906-6911.
- [10] Weed S A, Karginov A V, Schafer D A, Weaver A M, Kinley A W, Cooper J A, et al. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interaction with F-actin and the Arp2/3 complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151: 29-40.