

· 论著 ·

短程低氧条件下乳腺癌 BT549 细胞表达 beclin 1 基因对上皮间质转化的影响

郑临海 吴爱国 范旭龙 王梦川 邵国利 纪术峰 焦庆丽

【摘要】 目的 beclin 1 基因慢病毒表达载体稳定感染三阴性乳腺癌 BT549 细胞后,于短程低氧条件下探讨 beclin 1 基因对上皮间质转化(EMT)的影响。**方法** 用带有 pLenO-GTP Vector 及 pLenO-GTP-beclin 1 Vector 的慢病毒以感染复数(MOI)为 20 分别感染 BT549 细胞,即实验对照组及实验组,未感染细胞作为空白对照。感染 96 h 后用倒置荧光显微镜观察荧光,估计感染效率;用 Western blot 法检测 beclin 1 基因是否在 BT549 细胞中稳定表达;将各组细胞低氧培养 12、24 h 后采用荧光定量 PCR、Western blot 法及激光共聚焦显微镜检测 EMT 相关标志物;用 Western blot 法检测低氧培养 24 h 后的各组细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关蛋白表达水平。用两样本 t 检验分析低氧时间对细胞 EMT 相关标志物的表达情况,余计量资料用方差分析进行统计。**结果** 慢病毒感染 BT549 细胞 96 h 后,感染效率约为 100%,实验组 beclin 1 蛋白高效稳定表达($F=107.200, P=0.000$);低氧条件下,相对于空白对照组、实验对照组,实验组细胞的上皮标志物 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平上调(12 h: $F=122.451, P=0.000, F=29.651, P=0.001$; 24 h: $F=108.783, P=0.000, F=41.232, P=0.000$),而间皮标志物 N-cadherin、vimentin 及 fibronectin 表达水平下调(12 h: N-cadherin $F=92.918, P=0.000, F=138.034, P=0.000$, vimentin $F=135.313, P=0.000, F=39.765, P=0.000$, fibronectin $F=144.275, P=0.000$; 24 h: N-cadherin $F=76.064, P=0.000, F=40.614, P=0.000$, vimentin $F=206.576, P=0.000, F=46.658, P=0.000$, fibronectin $F=411.405, P=0.000$);相对于低氧培养 12 h,各组细胞低氧培养 24 h 后 E-cadherin 表达水平下调(空白对照组: $t=4.266, P=0.013, t=11.235, P=0.000$; 实验对照组: $t=10.463, P=0.000, t=4.092, P=0.009$; 实验组: $t=28.208, P=0.000, t=7.262, P=0.001$),而 N-cadherin(实验组除外)、vimentin 和 fibronectin 表达水平上调(空白对照组: N-cadherin $t=3.072, P=0.037, t=7.146, P=0.002$, vimentin $t=6.384, P=0.003, t=7.476, P=0.002$, fibronectin $t=8.389, P=0.001$; 实验对照组: N-cadherin $t=2.805, P=0.049, t=5.352, P=0.006$, vimentin $t=12.701, P=0.000, t=5.923, P=0.004$, fibronectin $t=7.318, P=0.002$; 实验组: N-cadherin $t=7.849, P=0.001, t=1.987, P=0.184$, vimentin $t=11.097, P=0.000, t=13.626, P=0.000$, fibronectin $t=11.003, P=0.000$); beclin 1 基因与低氧环境对 BT549 细胞 E-cadherin、N-cadherin 的表达水平有交互效应(E-cadherin: $F=19.175, P=0.000, F=5.588, P=0.015$; N-cadherin: $F=8.238, P=0.006, F=5.934, P=0.016$);低氧培养 24 h 后,实验组 Wnt/ β -catenin 信号通路的 β -catenin、Snail 蛋白水平下调(β -catenin: $F=18.169, P=0.003$; Snail: $F=11.098, P=0.010$),而 p-GSK-3 β 的蛋白水平上调($F=36.096, P=0.000$)。**结论** beclin 1 基因在短程低氧条件下抑制 BT549 细胞 EMT,而随时间的增加低氧促进 EMT; beclin 1 基因在短程低氧环境下抑制 EMT 的机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

【关键词】 乳腺肿瘤; 细胞低氧; 上皮间质转化; beclin 1

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Influence on epithelial-mesenchymal transition by transfecting beclin 1 in breast cancer BT-549 cells under short-term hypoxic condition Zheng Linhai, Wu Aiguo, Fan Xulong, Wang Mengchuan, Shao Guoli,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.01.004

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(S2012010009276)

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院普外科

通信作者:吴爱国,Email:wagtyz@sina.com

Ji Shufeng, Jiao Qingli. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China.

Corresponding author: Wu Aiguo, Email: wagtyz@sina.com

[Abstract] Objective To study the effect of beclin 1 gene on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in triple-negative breast cancer BT-549 cells under short-term hypoxic condition. **Methods** The pLenO-GTP-beclin 1 and pLenO-GTP lentivirus were infected into triple-negative breast cancer BT-549 cells respectively with (multiplicity of infection, MOI) = 20, which served as experimental group and negative control, uninfected BT-549 cells as blank control. The efficiency was evaluated by fluorescence at 96 h after infection, and beclin 1 protein were detected by Western blot. Then the cells were cultured under hypoxic condition for 12 h and 24 h. The mRNA levels of EMT markers were detected by RT-PCR, protein levels were detected by Western blot and laser scanning confocal microscope. At last, the levels of Wnt/ β -catenin related proteins were detected by Western blot in three groups under hypoxic condition for 24 h. The effect of hypoxic time on EMT was analyzed by two-sample *t*-test, the other measurement data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). **Results** The efficiency was approximately 100% at 96 h after infection, and the expression of beclin 1 protein was increased evidently in experimental group ($F = 107.200$, $P = 0.000$). Compared with negative control and blank control, the mRNA and protein levels of E-cadherin (epithelial marker) were upregulated in experimental group under hypoxic condition (12 h: $F = 122.451$, $P = 0.000$; $F = 29.651$, $P = 0.001$; 24 h: $F = 108.783$, $P = 0.000$; $F = 41.232$, $P = 0.000$), but the levels of N-cadherin, vimentin and fibronectin (mesenchymal markers) were downregulated (12 h: N-cadherin $F = 92.918$, $P = 0.000$; $F = 138.034$, $P = 0.000$; vimentin $F = 135.313$, $P = 0.000$; $F = 39.765$, $P = 0.000$; fibronectin $F = 144.275$, $P = 0.000$; 24 h: N-cadherin $F = 76.064$, $P = 0.000$; $F = 40.614$, $P = 0.000$; vimentin $F = 206.576$, $P = 0.000$; $F = 46.658$, $P = 0.000$; fibronectin $F = 411.405$, $P = 0.000$). Compared with 12 h, the mRNA and protein levels of E-cadherin were downregulated (blank control: $t = 4.266$, $P = 0.013$; $t = 11.235$, $P = 0.000$; negative control: $t = 10.463$, $P = 0.000$; $t = 4.092$, $P = 0.009$; experimental group: $t = 28.208$, $P = 0.000$; $t = 7.262$, $P = 0.001$) and the levels of N-cadherin (except the experimental group), vimentin and fibronectin were upregulated (blank control: N-cadherin $t = 3.072$, $P = 0.037$; $t = 7.146$, $P = 0.002$; vimentin $t = 6.384$, $P = 0.003$; $t = 7.476$, $P = 0.002$; fibronectin $t = 8.389$, $P = 0.001$; negative control: N-cadherin $t = 2.805$, $P = 0.049$; $t = 5.352$, $P = 0.006$; vimentin $t = 12.701$, $P = 0.000$; $t = 5.923$, $P = 0.004$; fibronectin $t = 7.318$, $P = 0.002$; experimental group: N-cadherin $t = 7.849$, $P = 0.001$; $t = 1.987$, $P = 0.184$; vimentin $t = 11.097$, $P = 0.000$; $t = 13.626$, $P = 0.000$; fibronectin $t = 11.003$, $P = 0.000$) in these groups under hypoxic condition for 24 h. For the expression of E-cadherin and N-cadherin, there was an interaction between beclin 1 and hypoxic stimulation (E-cadherin: $F = 19.175$, $P = 0.000$; $F = 5.588$, $P = 0.015$; N-cadherin: $F = 8.238$, $P = 0.006$; $F = 5.934$, $P = 0.016$). Expressions of Wnt/ β -catenin related proteins including β -catenin, snail were increased in experimental group (β -catenin: $F = 18.169$, $P = 0.003$; Snail: $F = 11.098$, $P = 0.010$), while p-GSK-3 β was decreased ($F = 36.096$, $P = 0.000$) under hypoxic condition for 24 h. **Conclusions** Under short-term hypoxic condition, beclin 1 gene inhibits EMT of BT-549 cells, but hypoxia promotes EMT with the increased hypoxic time. Wnt/ β -catenin signaling pathway may be involved in the mechanism of EMT inhibition of beclin 1 gene under hypoxic condition.

[Key words] Breast neoplasms; Cell hypoxia; Epithelial-mesenchymal transition; beclin 1

乳腺癌发病率占全球女性肿瘤的第一位(占女性全部癌症病例数的 23%),且乳腺癌导致的死亡病例占所有肿瘤致死病例的 14%^[1];三阴性乳腺癌是一种 ER、PR 和 HER-2 表达均为阴性的特殊乳腺癌类型,约占女性乳腺癌发病率的

15%,其转移早、预后差,现在主要的治疗方式是手术及新辅助化疗。

自噬是细胞在恶劣条件下确保其生存的基本应激反应,beclin 1 是启动细胞自噬的必需基因^[2]。BT549 细胞存在 beclin 1 等位基因缺失,转

染 beclin 1 基因后于正常及低氧环境下可抑制细胞的增殖、降低其迁移能力和促进自噬^[3]。肿瘤的恶性进展过程中,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进肿瘤细胞浸润、迁移和远处转移能力。研究证实 EMT 与三阴性乳腺癌有着密切的关系^[4]。笔者团队前期研究证实 beclin 1 基因能抑制 BT549 细胞发生 EMT^[3], 本实验旨在研究在短程低氧条件下乳腺癌细胞 BT549 beclin 1 基因表达与 EMT 的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三阴性人乳腺癌 BT549 细胞购自中国科学院上海分院细胞库, pLenO-GTP Vector、pLenO-GTP-beclin 1 Vector 的构建及慢病毒的包装委托上海英为信生物科技有限公司完成, Trizol 试剂盒、PrimeScript 逆转录试剂盒和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 兔抗人 beclin 1、 β -catenin、Snail、p-GSK-3 β 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 多克隆抗体购自美国 Signalway Antibody 公司, Alexa Fluor 594 驴抗兔 IgG 二抗购自美国 Invitrogen 公司, RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究, RPMI1640 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 细胞培养

BT549 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内。低氧培养至细胞融合度约为 80% 左右置于 1% O₂、94% N₂、5% CO₂ 培养箱内培养 12 h 和 24 h。

1.3 细胞转染及分组

BT549 细胞在 24 孔培养板中以细胞数 5×10^4 /孔接种若干孔, 每孔培养基体积为 100 μ l, 进行病毒感染时细胞的融合度约为 70% 左右; 第 2 天观察细胞生长状态, 若细胞状态较好就吸去旧的培养基, 加入含有感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 20 的 beclin 1 基因慢病毒量和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)对照病毒量的完全培养基 500 μ l, 即实验组和实验对照组, 24 h 后将含有慢病毒的培养液更换成正常培养液, 感染 96 h 用 DAPI 染核后倒置显微镜观察 GFP 表达

情况, 估计感染效率。其中, 未加病毒的 BT549 细胞为空白对照组。用 Western blot 法确认 beclin 1 基因稳定表达后进行后续实验。

1.4 RT-PCR 检测细胞低氧培养后 EMT 相关标志物 mRNA 表达情况

待细胞融合度 80% 左右低氧培养 12、24 h 后提取各组细胞总 RNA, ND-100 分光光度计测得 RNA 的纯度和含量, 并按 PrimeScript 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 然后以 20 μ l 反应体系 SyberGreen 荧光定量 PCR 检测。PCR 热循环参数: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算 mRNA 的变化。各基因的引物序列如下: E-钙黏蛋白(E-cadherin, 161 bp): 上游引物为 5'-AGTCACGCTGAATACAGTGG-3', 下游引物为 5'-CATTTTCTGGGCAGCTGATG-3'; N-钙黏蛋白(N-cadherin, 158 bp): 上游引物为 5'-CA GTGCAGTCTTATCG AAGG-3', 下游引物为 5'-GA AAGCTTCTCACGGC ATAC-3'; 波形蛋白(vimentin, 278 bp): 上游引物为 5'-CGCCAGATGCGTGA AAA TGG-3', 下游引物为 5'-ACCAGAGGGAGTGAATC CAGA-3'; 纤维结合蛋白(fibronectin, 156 bp): 上游引物为 5'-TTCCTTGCTGGTATCATGGCA-3', 下游引物为 5'-TATTCGGTTCCCGGTTCCA-3'; β -actin (594 bp): 上游引物为 5'-AGACGCCCAAGAACCA GG-3', 下游引物为 5'-GGAGTFCAGAGGGAAGGC AC-3'。

1.5 Western blot 检测细胞 EMT 相关标志物及 Wnt/ β -catenin 信号通路的蛋白表达情况

3 组细胞接种在六孔板贴壁后分别低氧培养 12、24 h, 严格按照 RIPA 裂解液(强)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书提取总蛋白并测定蛋白浓度, 按 4 : 1 体积加 5 \times 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, -80 °C 保存。等量蛋白样品 30 μ g 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶 80V 至上下胶分离处, 分离胶 120 V 70 min, 转膜 200 mA 120 min, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 孵育一抗(E-cadherin、N-cadherin、vimentin、 β -catenin、Snail 和 p-GSK-3 β) 4 °C 震荡过夜, 各一抗的稀释比率为 1 : 500(β -actin 为 1 : 3000), TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 孵育 800 nm 近红外二抗(抗兔)避光震荡 2 h, TBST 避光洗膜 3 次, 每次 5 min, 在 Odyssey 近红外双色激光成像系统(型号: 9120, 美

国 LI-COR 公司) 上扫膜, 结果用 Quantity One 4.6.2 软件分析。

1.6 激光共聚焦显微镜观察细胞低氧培养后 EMT 相关标志物蛋白表达情况

在玻底培养皿加入 3 ml 培养液, 在培养箱中放置 15 min。吸去培养液, 在底孔中加入 500 μ l 含适量细胞的培养液, 培养箱放置 2 h, 让细胞沉降贴壁, 贴壁后培养液增至 1 ml。细胞完全伸展后低氧培养 24 h 后固定、1% Triton 破膜、封闭, 用稀释比率为 1 : 100 的一抗 (E-cadherin、N-cadherin、vimentin) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 3 遍后稀释比率为 1 : 100 的 Alexa Fluor 594 驴抗兔 IgG 二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, DAPI 染核 20 min, PBS 洗 3 遍后 FV10i-W 型智能激光扫描共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司) 下拍照, 荧光强度用 Image Pro Plus 6.0 软件分析。

1.7 统计学分析

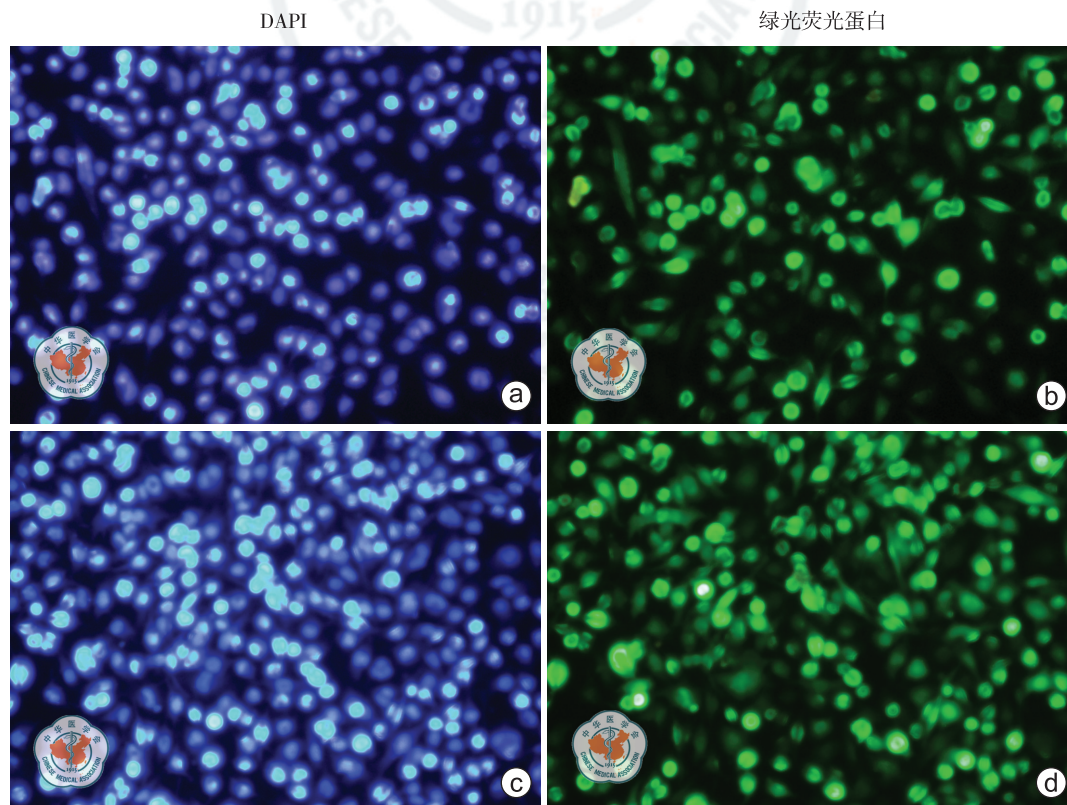
应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, RT-PCR、Western blot 和激光共聚焦图片荧光分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因设计分析转染 beclin 1 基因和低氧刺激对各组细胞 EMT 相关标志物表达

水平变化的交互作用, 其余计量资料按单因素方差分析, 多个样本均数如满足方差齐性采用 SNK 法进行两两比较, 如不满足方差齐性则采用 Dunnett's T3 统计, 两样本均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

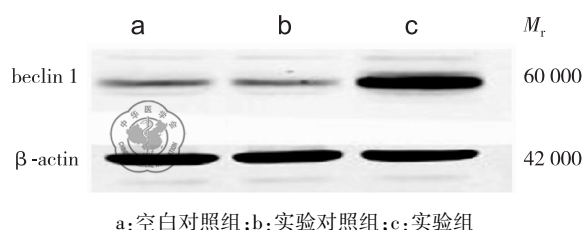
2.1 慢病毒感染 BT549 细胞及 beclin 1 基因蛋白表达情况

慢病毒感染 BT549 细胞 96 h 用 DAPI 染核后倒置荧光显微镜观察 GFP 表达, 结果显示慢病毒以 MOI 值为 20 感染 BT549 细胞时, 其感染效率约为 100% (图 1)。Western blot 测定 beclin 1 蛋白表达情况: 在相对分子质量 (M_r) = 42 000 处, 空白对照组、实验对照组和实验组的内参 β -actin 相对较齐, 在 M_r = 60 000 的目的蛋白 beclin 1 处, 实验组的相对印迹条带灰度 (1.453 ± 0.192) 明显强于空白对照组和实验对照组, 组间差异具有统计学意义 [(0.313 ± 0.098) 比 (0.274 ± 0.061) , $F = 107.200$, $P = 0.000$], 而空白对照组和实验对照组间差异无统计学意义 ($P = 0.684$) (图 2)。



a, b: 实验对照组; c, d: 实验组

图 1 倒置荧光显微镜下观察慢病毒感染 BT549 细胞效率 (DAPI 染核 $\times 200$)



a:空白对照组;b:实验对照组;c:实验组

图2 Western blot 检测细胞 beclin 1 蛋白表达情况

2.2 短程低氧条件下 EMT 相关标志物 mRNA 表达

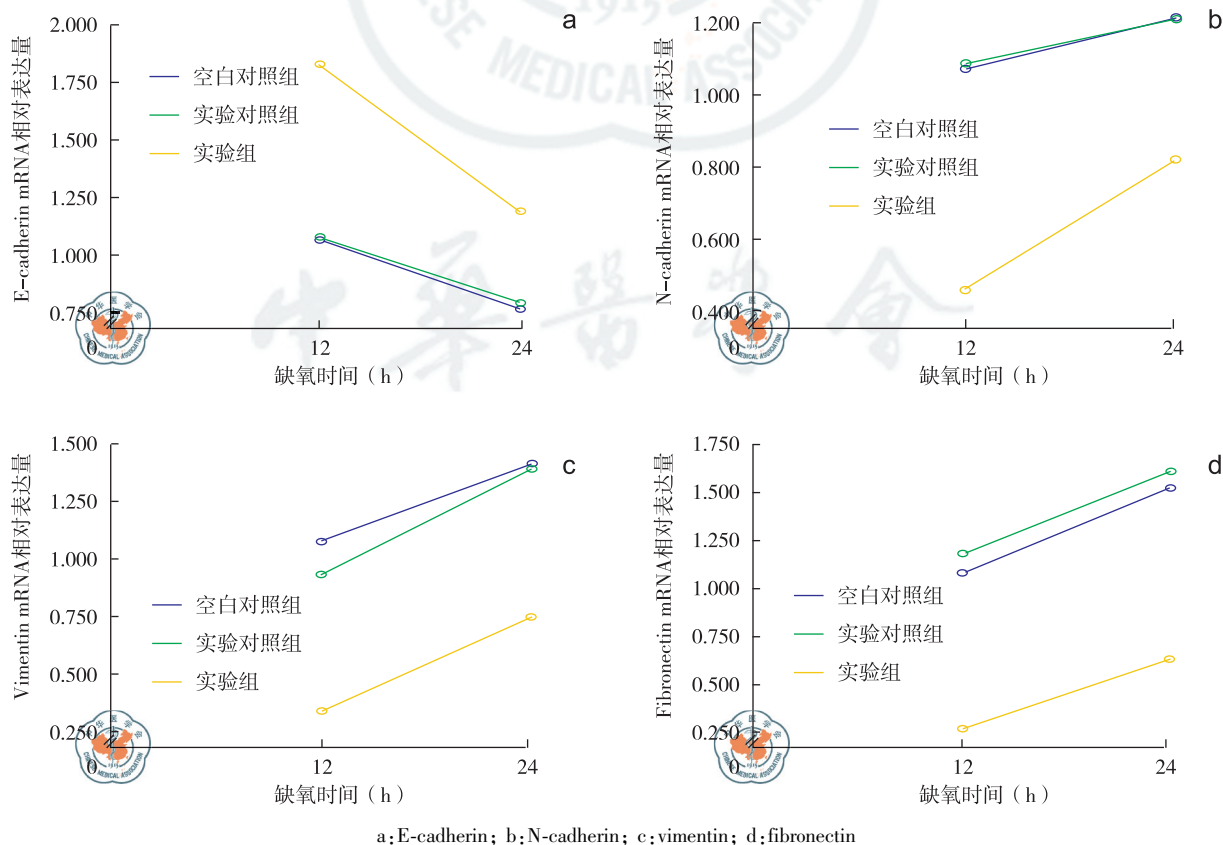
各组细胞低氧培养 12 h 和 24 h 后,各组间 EMT 相关标志物 mRNA 表达水平差异都具有统计学意义。与空白对照组和实验对照组相比,实验组两时间点的 E-cadherin mRNA 表达水平均升

高, N-cadherin、vimentin、fibronectin 的 mRNA 表达水平均下降,而空白对照组与实验对照组间差异无统计学意义;不同低氧时间之间 EMT 相关 mRNA 表达差异有统计学意义,E-cadherin、fibronectin mRNA 表达水平随低氧时间下降, N-cadherin、vimentin mRNA 表达水平随低氧时间升高,统计结果详见表 1。转染 beclin 1 基因和低氧刺激对 E-cadherin、N-cadherin 的 mRNA 表达水平有交互作用(E-cadherin: $F=19.175$, $P=0.000$; N-cadherin $F=8.238$, $P=0.006$),对 vimentin、fibronectin 的 mRNA 表达水平没有交互作用(vimentin: $F=2.046$, $P=0.172$; fibronectin: $F=0.829$, $P=0.460$)(图 3)。

表1 各组细胞低氧培养 12、24 h 后 EMT 相关标志物相对 mRNA 表达水平

组别	培养 12 h 后				培养 24 h 后			
	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	fibronectin	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	fibronectin
空白对照组	1.067±0.111	1.074±0.070	1.078±0.070	1.080±0.075	0.767±0.050	1.215±0.038	1.416±0.059	1.526±0.053
实验对照组	1.079±0.037	1.087±0.067	0.933±0.049	1.181±0.091	0.792±0.030	1.213±0.039	1.393±0.039	1.609±0.045
实验组	1.828±0.018	0.458±0.056	0.339±0.054	0.270±0.041	1.190±0.035	0.817±0.057	0.749±0.035	0.630±0.040
<i>F</i> 值	122.451	92.918	135.313	144.275	108.783	76.064	206.576	411.405
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

组内两时间点的比较采用 *t* 检验, P 均 <0.05 ;组间两两比较采用 SNK 法(培养 12 h 后 E-cadherin mRNA 水平因方差不齐,故采用 Dunnett's T_3 法), P 均 <0.05



a: E-cadherin; b: N-cadherin; c: vimentin; d: fibronectin

图3 各组细胞分别在低氧培养 12 h 和 24 h 后 EMT 相关标志物 mRNA 的表达变化

2.3 短程低氧条件下 EMT 相关标志物蛋白表达

低氧 12 h 和 24 h 后, Western blot 检测各组 EMT 相关标志物蛋白表达水平, 结果显示: 各组细胞在 12 h 和 24 h 两时间点的 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平差异都具有统计学意义, 与空白对照组和实验对照组比较, 实验组的 E-cadherin 蛋白表达水平上调, N-cadherin、vimentin 的蛋白表达水平下调, 而空白对照组和实验对照组间差异无统计学意义(统计结果详见表 2); 除实验组两时间点 N-cadherin 蛋白表达无差异外, 不同低氧时间点之间 EMT 相关蛋白表达差异有统计学意义, E-cadherin 蛋白表达水平随低氧时间下调, N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平随低氧时间上调(图 4); 转染 beclin 1 基因和低氧刺激对 E-cadherin、N-cadherin 的蛋白表达水平有交互作用(E-cadherin: $F = 5.588$, $P = 0.015$; N-cadherin: $F = 5.934$, $P = 0.016$), 对 vimentin 的蛋白表达水平没有交互作用($F = 0.107$, $P = 0.900$)

(图 5)。各组细胞低氧培养 24 h 后, 激光共聚焦显微镜下观察 EMT 相关标志物蛋白表达水平, 结果显示: 各组 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平差异都具有统计学意义, 实验组 E-cadherin 表达的荧光强度($40\ 738.018 \pm 5343.637$) 高于空白对照组($28\ 385.496 \pm 4143.292$) 和实验对照组($28\ 804.766 \pm 7691.387$), N-cadherin、vimentin 表达的荧光强度($11\ 933.560 \pm 2269.632$ 、 $46\ 768.475 \pm 2379.603$) 低于空白对照组($28\ 275.775 \pm 5505.788$ 、 $69\ 393.337 \pm 9212.869$) 和实验对照组($25\ 488.893 \pm 5167.678$ 、 $68\ 975.898 \pm 10\ 373.393$), 而空白对照组和实验对照组间差异无统计学意义(图 6, 统计结果详见表 3)。

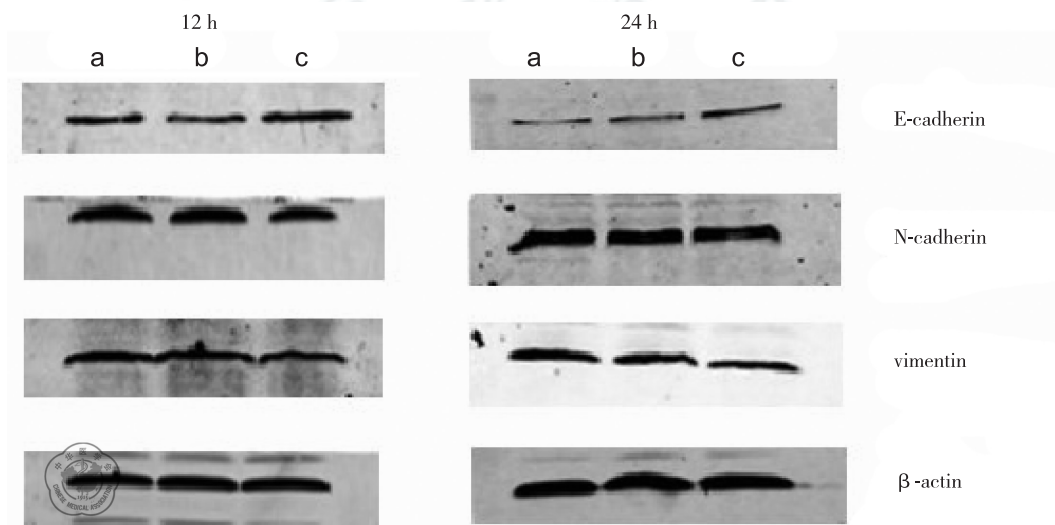
2.4 Wnt/ β -catenin 信号通路表达水平

各组细胞低氧培养 24 h 后, 组间 p-GSK-3 β 、 β -catenin、Snail 的蛋白表达水平差异具有统计学意义, 相对于空白对照组和实验对照组, 实验组 β -catenin、Snail 的蛋白表达水平均下调, p-GSK-3 β

表 2 各组细胞低氧培养 12、24 h 后 EMT 相关标志物蛋白表达

组别	培养 12 h 后			培养 24 h 后		
	E-cadherin	N-cadherin	vimentin	E-cadherin	N-cadherin	vimentin
空白对照组	0.326 \pm 0.023	0.687 \pm 0.021	0.421 \pm 0.039	0.183 \pm 0.011	0.839 \pm 0.030	0.616 \pm 0.023
实验对照组	0.288 \pm 0.040	0.723 \pm 0.009	0.426 \pm 0.032	0.198 \pm 0.018	0.800 \pm 0.023	0.610 \pm 0.043
实验组	0.494 \pm 0.040	0.552 \pm 0.003	0.231 \pm 0.017	0.306 \pm 0.030	0.604 \pm 0.045	0.410 \pm 0.015
<i>F</i> 值	29.651	138.034	39.765	41.232	40.614	46.658
<i>P</i> 值	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

组内两时间点的比较采用 *t* 检验, 除实验组两时间点 N-cadherin 蛋白表达无差异外, P 均 <0.05 ; 组间两两比较采用 SNK 法, P 均 <0.05



a: 空白对照组; b: 实验对照组; c: 实验组

图 4 Western blot 检测各组细胞低氧培养 12 h 和 24 h 后 EMT 相关标志物蛋白表达情况

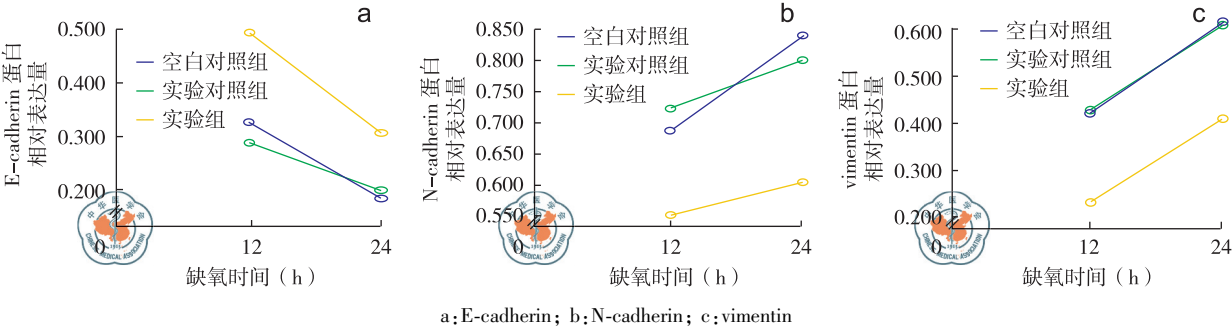
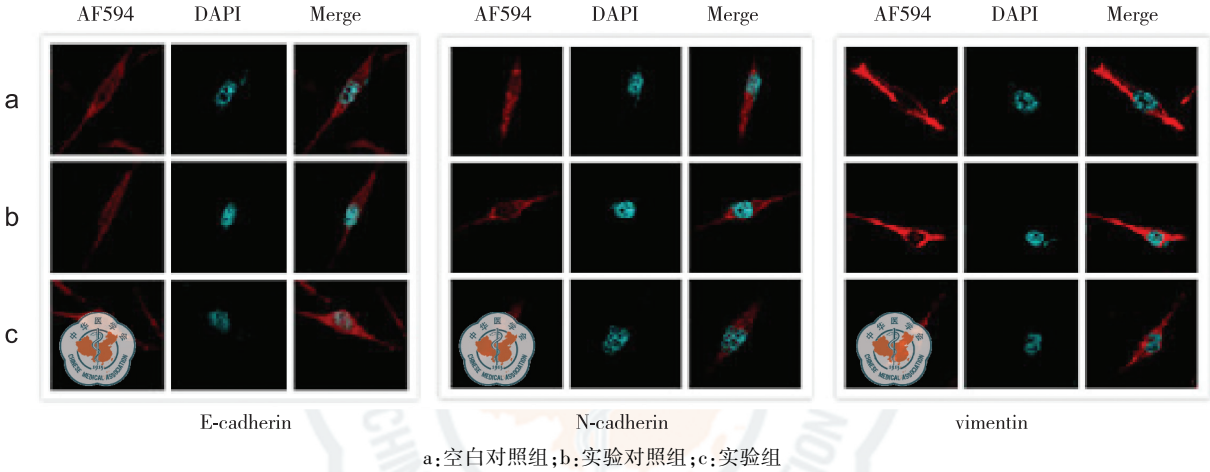


图 5 各组细胞分别在低氧培养 12 h 和 24 h 后 EMT 相关标志物蛋白的表达变化



AF594 为荧光二抗 Alexa Fluor 594 标记目的蛋白, DAPI 染核, Merge 为合成图像

图 6 激光共聚焦显微镜观察各组细胞低氧培养 24 h 后 EMT 相关标志物蛋白表达(×600)

表 3 各组细胞低氧培养 24 h 后 EMT 相关标志物蛋白荧光强度

组别	E-cadherin	N-cadherin	vimentin
空白对照组	28 385.496±4143.292	28 275.775±5505.788	69 393.337±9212.869
实验对照组	28 804.766±7691.387	25 488.893±5167.678	68 975.898±10 373.393
实验组	40 738.018±5343.637	11 933.560±2269.632	46 768.475±2379.603
F 值	5.629	14.753	10.146
P 值	0.026	0.001	0.005

组间两两比较采用 SNK 法, P 均 <0.05

的蛋白表达水平上调,而空白对照组和实验对照组间差异无统计学意义(图 7,统计结果详见表 4)。

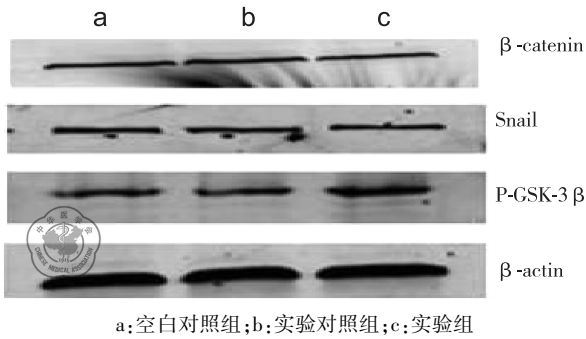


图 7 Western blot 检测各组细胞低氧培养 24 h 后 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达

表 4 各组细胞低氧培养 24 h 后 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达

组别	β -catenin	Snail	p-GSK-3 β
空白对照组	0.553±0.038	0.298±0.056	0.244±0.029
实验对照组	0.554±0.032	0.302±0.036	0.219±0.030
实验组	0.369±0.055	0.168±0.018	0.390±0.018
F 值	18.169	11.098	36.096
P 值	0.003	0.010	0.000

组间两两比较采用 SNK 法, P 均 <0.05

3 讨论

肿瘤的远处转移是治疗过程中遇到最棘手的

问题,也是患者生存率降低的最重要原因。目前认为,循环肿瘤细胞(CTCs)是导致肿瘤远处转移的重要原因,并且,CTCs的数量和特殊的分子表型与CTCs的转移能力密切相关^[5]。研究证实,EMT与CTCs从原发肿瘤灶血管内渗以及播撒到远处转移灶密切相关^[6],具有EMT特性的CTCs是导致三阴性乳腺癌发生转移的主要细胞^[7-8]。

自噬是存在于真核细胞内一种普遍的生命现象,该现象对肿瘤细胞的生长和死亡具有重要的调控作用。beclin 1 是一种抑癌基因,研究表明,存在 beclin 1 等位失活的小鼠罹患肿瘤的风险明显增高^[9];然而 Gong 等^[10]发现 beclin 1 基因及自噬对肿瘤干细胞的致瘤性起着重要的作用。笔者团队前期在 beclin 1 诱导三阴性乳腺癌自噬方面已做了相关工作,结果显示在正常和低氧环境下,转染 beclin 1 基因促进 BT549 细胞发生自噬及凋亡,抑制细胞增殖并降低其迁移能力^[3]。

为探讨 beclin 1 基因对 EMT 的影响,笔者发现在正常环境下 beclin 1 基因可抑制 BT549 细胞发生 EMT。基于此结果,本实验通过慢病毒感染 BT549 细胞使 beclin 1 基因稳定表达,低氧培养 12 h 和 24 h 后结果显示:短程低氧环境下 beclin 1 基因亦可上调 BT549 细胞的上皮标志物 E-cadherin 表达水平,下调细胞的间皮标志物 N-cadherin、vimentin、fibronectin 表达水平,抑制其发生 EMT;然而,与低氧 12 h 比较,细胞低氧 24 h 后 E-cadherin 表达水平下调、N-cadherin、vimentin、fibronectin 表达水平上调,beclin 1 与低氧环境对 EMT 的影响存在交互作用;值得一提的是,有研究认为在低氧条件下产生的低氧诱导因子-1 α 可以通过上调 snail 的转录促进肿瘤细胞发生 EMT^[11],这一现象与本研究相符,至于长程低氧与 beclin 1 基因的相互作用对 EMT 的最终效应如何还需进一步研究。但可以肯定的是 beclin 1 基因在短程低氧环境下可抑制 BT549 细胞的 EMT,其机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,这进一步验证了部分学者的相关研究^[12-13]。Li 等^[14]发现,饥饿引起肝细胞癌的自噬可通过 EMT 的发生提高细胞的侵袭性,这似乎与本研究结果不一致。笔者认为这可能与自噬的程度、发生自噬的条件等有关。

虽然 beclin 1 基因在 BT549 细胞中的过表达于短程低氧环境下抑制细胞的 EMT,但使其发生自噬,有效应对了低氧的应激,促进了细胞的存活,为以后肿瘤的复发留下了隐患。有关 beclin 1 基因对三阴性乳腺癌细胞的影响还需继续研究,从而为其在乳腺癌的临床应用提供有力的依据。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR [J]. Nature, 2010, 465(7300): 942-946.
- [3] 原红军,吴爱国,王梦川,等. 正常和低氧环境下转染 beclin-1 对乳腺癌细胞 BT-549 的抑制作用[J/CD]. 中华乳腺病杂志;电子版,2012,6(4):383-393.
- [4] Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype [J]. Cancer Res, 2008, 68(4): 989-997.
- [5] Balic M, Williams A, Lin H, et al. Circulating tumor cells: from bench to bedside [J]. Annu Rev Med, 2013, 64: 31-44.
- [6] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease [J]. J Cell Biol, 2006, 172(7): 973-981.
- [7] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition [J]. Science, 2013, 339(6119): 580-584.
- [8] Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells [J]. Pathobiology, 2012, 79(4): 195-208.
- [9] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin1/autophagy gene [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [10] Gong C, Bauvy C, Tonelli G, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells [J]. Oncogene, 2013, 32(18): 2261-2272.
- [11] Zhang L, Huang G, Li X, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL by hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 108.
- [12] van der Velden JL, Guala AS, Leggett SE, et al. Induction of a mesenchymal expression program in lung epithelial cells by wingless protein (Wnt)/ β -catenin requires the presence of c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK1) [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(3): 306-314.
- [13] Yook JI, Li XY, Ota I, et al. A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade

regulates Snail1 activity in breast cancer cells [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(12): 1398-1406.

epithelial-mesenchymal transition [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1343-1351.

[14] Li J, Yang B, Zhou Q, et al. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of

(收稿日期:2013-11-12)

(本文编辑:刘军兰)

郑临海,吴爱国,范旭龙,等. 短程低氧条件下乳腺癌细胞 BT549 表达 beclin 1 基因对上皮间质转化的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2014,8(1):13-21.

