

• 论著 •

# 高表达 twist 基因促进三阴性乳腺癌 SUM159 细胞干性特征的初步研究

曾真 甘霖 王亚冬 闵捷 王婷 廖登辉 吕钢

**【摘要】 目的** 探讨高表达 twist 基因对乳腺癌 SUM159 细胞干性特征的影响。**方法** 用慢病毒构建过表达 twist 基因的乳腺癌 SUM159 细胞作为实验组 (SUM159/twist), 空载体构建对照组细胞 (SUM159/vector)。利用 RT-PCR 检测 twist 转染前后 mRNA 水平变化; 通过平板克隆形成、成球实验、流式细胞仪检测肿瘤干细胞比例, 并用 RT-PCR 检测干性相关基因 SOX2、OCT4、BMI1 的 mRNA 表达水平。mRNA 及细胞克隆数等计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验。**结果** 成功构建过表达 twist 基因的乳腺癌 SUM159 细胞, SUM159/twist 细胞中的 twist mRNA 表达为  $2.04 \pm 0.15$ , 高于 SUM159/vector 细胞的  $0.49 \pm 0.45$  ( $t = -16.33, P < 0.001$ ); SUM159/twist 细胞的克隆菌落数目 ( $92.75 \pm 4.85$ ) 明显高于 SUM159/vector 细胞 ( $44.50 \pm 5.19$ ) ( $t = 13.56, P < 0.001$ ); 成球实验显示: SUM159/twist 细胞形成的细胞球数目 ( $46.75 \pm 4.11$ ) 显著高于 SUM159/vector 细胞 ( $22.50 \pm 3.41$ ) ( $t = 9.07, P < 0.001$ ); 利用流式细胞仪检测 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞中的 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例发现: SUM159/twist 细胞中 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例为 ( $9.63 \pm 0.89$ )%, 显著高于 SUM159/vector 细胞中的 ( $2.31 \pm 0.21$ )% ( $t = 13.85, P < 0.001$ ); SUM159/twist 细胞中 SOX2、OCT4、BMI1 的表达 ( $12.39 \pm 0.63, 13.35 \pm 1.56, 6.48 \pm 0.96$ ) 均高于 SUM159/vector 细胞 ( $1.61 \pm 0.33, 2.67 \pm 0.28, 2.70 \pm 0.35$ ) ( $t = -29.68, -11.61, 6.43; P$  均  $< 0.001$ )。**结论** twist 基因能够增强乳腺癌 SUM159 细胞干性能力。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 转录因子; 肿瘤干细胞

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标志码】** A

**Preliminary study on high expression of twist gene promoting the stemness related characteristics of triple negative breast cancer SUM159 cells** Zeng Zhen, Gan Lin, Wang Yadong, Min Jie, Wang Ting, Liao Denghui, Lyu Gang. Department of Breast and Thyroid Surgery, the First Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chongqing Municipality, Chongqing 400011, China

Corresponding author: Lyu Gang, Email: cqszyyxxk@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact of high expression of twist gene on the stemness related characteristics of breast cancer SUM159 cells. **Methods** We established a twist-overexpression breast cancer SUM159 cell line as experimental group (SUM159/twist), and the cells with blank vector construction served as control group (SUM159/vector). The twist mRNA level were detected before and after twist gene transfection using RT-PCR. The proportion of cancer stem cells was investigated by flat clone formation, mammosphere assay and flow cytometry. The mRNA expressions of stemness-related genes SOX2, OCT4 and BMI1 were detected by RT-PCR. All data were expressed as  $\bar{x} \pm s$  and processed by  $t$  test. **Results** SUM159 cells with twist gene overexpression were successfully established. The relative expression of twist mRNA in SUM159/twist cells was  $2.04 \pm 0.15$ , significantly higher than  $0.49 \pm 0.45$  in SUM159/vector cells ( $t = -16.33, P < 0.001$ ). The colony number of clone formation was  $92.75 \pm 4.85$  in SUM159/twist cells, significantly higher than  $44.50 \pm 5.19$  in SUM159/vector cells ( $t = 13.56, P < 0.001$ ). The mammosphere number was  $46.75 \pm 4.11$  in SUM159/twist cells and  $22.50 \pm 3.41$  in SUM159/vector cells, and the difference was statistically significant ( $t = 9.07, P < 0.001$ ). Flow cytometry results showed that the proportion of ALDH1<sup>+</sup> was ( $9.63 \pm 0.89$ )% in SUM159/twist cells and ( $2.31 \pm 0.21$ )% in SUM159/vector cells, indicating a significant difference ( $t =$

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2015.06.005

基金项目:2014 年重庆市科学技术委员会前沿与应用基础研究项目 (cstc2014jcyjA83)

作者单位:400011 重庆市第一中医院乳腺甲状腺科

通信作者:吕钢, Email: cqszyyxxk@163.com

13.85,  $P < 0.001$ ). The relative mRNA expressions of SOX2, OCT4 and BMI1 in SUM159/twist cells were  $12.39 \pm 0.63$ ,  $13.35 \pm 1.56$  and  $6.48 \pm 0.96$ , significantly higher than  $1.61 \pm 0.33$ ,  $2.67 \pm 0.28$  and  $2.70 \pm 0.35$  in SUM159/vector cells respectively ( $t = -29.68, -11.61, 6.43$ , all  $P < 0.001$ ). **Conclusion** The twist gene promotes the stemness related capability of breast cancer SUM159 cells.

**【Key words】** Breast neoplasms; Transcription factor; Neoplastic stem cells

乳腺癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 研究发现, 肿瘤干细胞与乳腺癌的复发、转移密切相关<sup>[2]</sup>。转录因子 twist, 不仅在乳腺癌中呈高表达, 且与不良预后相关<sup>[3]</sup>; 还能诱导 ER 阳性的乳腺癌细胞发生上皮间质转化, 使其具有肿瘤干细胞特征<sup>[4]</sup>。三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是一种恶性程度高、易复发和转移的乳腺癌亚型, 也是乳腺癌研究的热点。但是 twist 基因在 TNBC 中的作用及机制尚不完全清楚。因此, 本研究通过构建 twist 基因过表达的三阴性乳腺癌 SUM159 细胞, 探讨 twist 基因对具有高侵袭能力的 SUM159 细胞干性特征的影响, 为进一步研究 TNBC 提供细胞模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SUM159 细胞购自美国模式菌种收集中心; F12、DF12 细胞培养基、FBS 购自美国 GIBCO 公司; 转染载体质粒和含 twist 基因重组逆转录病毒均由上海吉凯基因公司完成, 脂质体 2000 和干性培养因子碱性表皮生长因子、表皮生长因子和胰岛素均购自美国 Invitrogen 公司; 普通 6 孔板和低黏附 24 孔板购自上海康宁公司; RNA 试剂盒购自日本 Takara 公司; SOX2、OCT4、BMI1 引物序列构建于上海吉凯生物公司; Western blot 试验相关耗材购自北京碧云天公司, twist 一抗 (鼠抗人)、二抗 (兔抗鼠)、 $\beta$ -actin 抗体、人乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) 1 抗体等均购自北京中杉金桥公司, 腺病毒液 AD-twist-IRES-EGFP 病毒液和 AD-EGFP 阴性病毒液由上海吉凯生物技术有限公司构建并提供。

### 1.2 细胞培养

乳腺癌细胞系 SUM159 细胞采用含 5% FBS、1% 青-链霉素双抗、5  $\mu\text{g/ml}$  胰岛素、1  $\mu\text{g/ml}$  氢化可的松的 F12 液体培养体系, 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  浓度的培养箱中培养, 每 2~3 d 换液 1 次。成球细胞培养为含培养因子 B27 (2%)、bFGF (20 ng/ml)、EGF (20 ng/ml)、FBS (0.5%) 的 DF12 培养基。培养条件同上。

### 1.3 转染筛选稳定过表达 twist 的 SUM159 细胞

构建 twist 基因的逆转录病毒表达载体质粒和包装携带有 twist 基因重组逆转录病毒。其 twist 过表达载体序列: 5'-CGCGCGGATCCAGATGATGCAGGACGTGTC-3' (上游), 5'-CGCCCCGGAATTCGTGGGACGCGGACATGG A-3' (下游)。将生长状态良好的 SUM159 细胞消化, 制成细胞悬液, 将细胞按 1:3 传代于 48 孔板中, 放入 37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养至细胞融合度至 80%, 根据细胞数目选择合适的感染细胞的病毒颗粒数与实际细胞数的比值 (MOI) 梯度, 并给予相应剂量的腺病毒液, 感染 24 h 后, 换液; 待感染 48 h 后, 荧光显微镜观察各孔内的绿色荧光蛋白的表达情况, 以确定最佳 MOI 值; 以最佳 MOI 值再次感染 SUM159 细胞, 48 h 后, 选取荧光率大于 80% 的孔, 每孔加入 1 ml Trizol 进行 RNA 抽取, RT-PCR 实验检测 twist 基因在 mRNA 水平的表达情况 (具体实验步骤见下文)。另一部分细胞利用流式细胞仪分选 GFP 的细胞, 传代培养。转染成功的实验组 SUM159 细胞命名为 SUM159/twist, 空载组为 SUM159/vector。

### 1.4 RT-PCR 实验

Trizol 法提取 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞中总的 RNA, 并检测其纯度, 逆转录反应参考说明书, 以逆转录所得 cDNA 为模板, 进行定量 PCR 实验; twist 上游引物: 5'-GGAGTCCGCA GTCTTACGAG-3', 下游引物: 3'-CTGGAGGACCT GGTAGAGG-5', SOX2 上游引物: 5'-CAGCCCATGC ACCGCTACGACG-3', 下游引物: 3'-CACCGAACCC ATGGAGCCAAGAGC-5'; OCT4 上游引物: 5'-GCA GCGACTATGCACAACGA-3', 下游引物: 3'-CCAGA GTGGTGACGGAGACA-5'; BMI1 上游引物: 5'-TCG TTCTTGTTATTACGCTGTTTT-3', 下游引物: 3'-CG GTAGTACCCGCTTTTAGGC-5'; 内参  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-TTGCGTTACACCCTTTCTTG-3', 下游引物: 3'-CACCTTCACCGTTCCAG TTT-5'。

### 1.5 克隆形成实验

将生长良好的 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞, 按每孔 300 个细胞接种于 24 孔板中, 放入培养箱中培养, 每 3 d 观察细胞状态, 并更换

培养基, 12 d 后, 弃培养基, PBS 洗两遍后, 加入 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 15 min, 然后用 PBS 清洗两遍, 拍照。重复该实验 3 次。

### 1.6 成球能力实验

取生长状态良好的 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞制成单细胞悬液, 用流式仪将细胞接种至含有成球培养基的 24 孔低黏附板中, 并每天轻轻晃动 1 次, 防止细胞贴壁。待 7 d 后, 观察细胞成球大小、计算成球数目并拍照。重复该实验 3 次。

### 1.7 流式细胞仪检测 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例

参照 ALDH1<sup>+</sup> 抗体说明书进行, 简要如下: 将 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞消化、离心后弃去上清液, 用 PBS 洗 2 遍后, 用 500  $\mu$ l 反应缓冲液重悬细胞, 并调整细胞数至  $1 \times 10^6$ /ml, 并设对照组和实验组。对照组中加入 ALDH1 的同型对照抗体 5  $\mu$ l, 实验组加入 5  $\mu$ l 的 ALDH1 抗体, 将细胞放入 4  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后, 再将两组细胞以 1 000 r/min (离心机半径 6 cm) 离心 5 min, 吸去上清液, 分别再用 300  $\mu$ l 缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪检测 ALDH1<sup>+</sup> 细胞的比例。该实验重复 3 次。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行数据处理。mRNA 及细胞克隆数等计量资料表达量以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验结果以  $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利用 RT-PCR 检测 SUM159/twist 和 SUM159/vector 细胞中 twist 在 mRNA 水平的表达

SUM159/Twist 细胞中的 twist mRNA 表达为  $2.04 \pm 0.15$ , 高于 SUM159/vector 细胞的  $0.49 \pm 0.45$ , 差异具有统计学意义 ( $t = -16.33, P < 0.001$ )。

### 2.2 twist 基因过表达后对 SUM159 细胞克隆形成能力的影响

SUM159/Twist 细胞能够形成较多的克隆菌落 ( $92.75 \pm 4.85$ ), 而 SUM159/vector 细胞的克隆形成能力较弱 ( $44.50 \pm 5.19$ ), 两组比较差异具有统计学意义 ( $t = 13.56, P < 0.001$ ) (图 1)。

### 2.3 twist 基因过表达后对 SUM159 细胞成球能力的影响

SUM159/twist 细胞形成的细胞球较多且相对较大 ( $46.75 \pm 4.11$ ), 而 SUM159/vector 细胞的细胞球较小且少 ( $22.50 \pm 3.41$ ), 两组比较差异具有统计学意义 ( $t = 9.07, P < 0.001$ ) (图 3)。

### 2.4 twist 基因过表达后对 SUM159 细胞中 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例的影响

SUM159/twist 细胞中 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例为  $(9.63 \pm 0.89)\%$ , 显著高于 SUM159/vector 细胞的  $(2.31 \pm 0.21)\%$ , 两组比较差异有统计学意义 ( $t = 13.85, P < 0.001$ ) (图 3)。

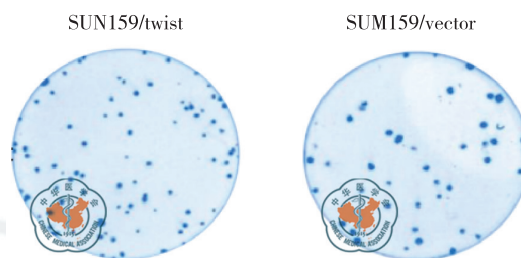


图 1 twist 基因过表达后对乳腺癌 SUM159 细胞克隆形成能力的影响

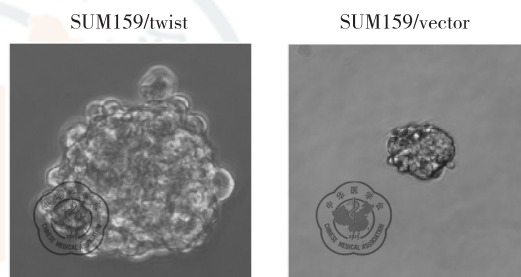
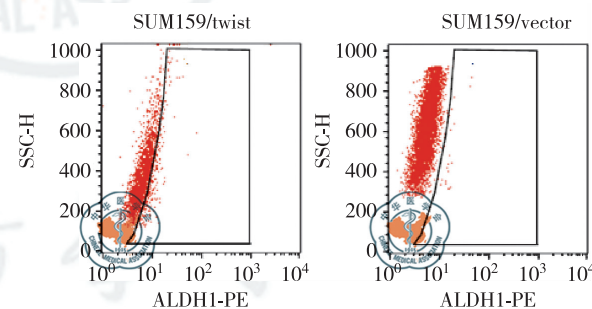


图 2 twist 基因过表达后对乳腺癌 SUM159 细胞成球能力的影响



注: SSC-H 代表侧向散射角

图 3 twist 基因过表达后对乳腺癌 SUM159 细胞中 ALDH1<sup>+</sup> 细胞比例影响的流式细胞图

### 2.5 twist 基因过表达后对 SUM159 细胞中干性相关基因 SOX2、OCT4、BMI1 表达的影响

SUM159/twist 细胞中 SOX2、OCT4、BMI1 的表达分别为  $12.39 \pm 0.63$ 、 $13.35 \pm 1.56$ 、 $6.48 \pm 0.96$ , 均显著高于 SUM159/vector 细胞的表达  $1.61 \pm 0.33$ 、 $2.67 \pm 0.28$ 、 $2.70 \pm 0.35$ , 差异具有统计学意义 ( $t = -29.68, -11.61, 6.43, P$  均  $< 0.050$ )。

## 3 讨论

远处转移是乳腺癌死亡的重要原因, 转录因



子 twist 在该过程中发挥了重要作用。有研究发现, twist1 基因可以与 E-钙黏蛋白的启动子序列结合, 抑制细胞间黏附分子的转录表达, 从而活化上皮间质转化而促使肿瘤发生转移<sup>[5]</sup>, Ai 等<sup>[6]</sup>研究也发现: twist 能抑制肿瘤抑制因子 TRIM29 的启动子活性, 降低 TRIM29 的表达, 从而促进乳腺癌的迁移、浸润和转移。TNBC 易发生脑、肺及肝等重要脏器的转移, 是预后较差的一个乳腺癌亚型, 然而, twist 基因在三阴性乳腺癌细胞中的表达及促进转移的机制却不完全清楚。

肿瘤干细胞理论学说为学者们深入认识肿瘤的发生、发展机制开辟了新的视野, 已成为研究的热点。肿瘤干细胞是一群具有自我更新能力并可分化为异质性肿瘤细胞的细胞亚群<sup>[7]</sup>, 因此, 具有较强自我更新能力被认为是鉴定肿瘤干细胞的标准之一。本研究发现: SUM159/twist 细胞的克隆菌落数目为高于 SUM159/vector 细胞的克隆菌落数目; 成球实验也发现 SUM159/twist 细胞也具有更强的成球能力。这说明 twist 增加了 SUM159/twist 细胞的自我更新能力。此外有研究发现: 利用肿瘤表面标记物分选的细胞也具有肿瘤干细胞特征, 而是乳腺癌中较为常用的肿瘤干细胞分选标记物之一<sup>[8]</sup>, 因此本研究利用 ALDH 作为肿瘤干细胞标志物来检测肿瘤干细胞的比较。结果发现: 在转录 twist 基因后, SUM159 细胞中 ALDH1<sup>+</sup> 的比例由 (2.31±0.21)% 提高到 (9.63±0.89)%, 表达比例明显增加。这些结果表明: 转录 twist 基因后, SUM159 细胞的干性相关特征增强。

干性相关基因 SOX2、OCT4 在干细胞的增殖、分化、自我更新等多个生物学过程中发挥着重要的作用<sup>[9-10]</sup>, 而 BMI1 基因的表达也与肿瘤干细胞密切相关<sup>[11]</sup>。本研究初步发现, 同 SUM159/vector 细胞相比, SUM159/twist 细胞中 SOX2、OCT4、BMI1 基因的表达明显上调。其作用机制尚不清楚。近来有研究报道: twist2 基因过表达后能够促进肝癌 HepG2 细胞自我更新能力增强, 而敲减该基因后, 能够下调 SOX2、NANOG、BMI1、CD24 的表达, 其机制是通过 twist2-CD24-STAT3-NANOG 信号通路发挥作用的<sup>[12]</sup>, 然而, 在 TNBC 中, twist 基因是如何调节干性相关基因的表达, 从而影响 TNBC 细胞的干性特征仍未可知, 需进一步研究。

综上所述, twist 基因的表达可能与肿瘤干细

胞密切相关。本研究成功建立了 twist 基因稳定表达细胞系, 并初步探讨了 twist 基因对 SUM159 细胞干性特征的影响, 为下一步研究 twist 基因调控三阴性乳腺癌干细胞特征及分子机制的研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells [J]. N Engl J Med, 2007, 356(3): 217-226.
- [3] Xu Y, Hu B, Qin L, et al. SRC-1 and Twist1 expression positively correlates with a poor prognosis in human breast cancer [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(4): 396-403.
- [4] Fang X, Cai Y, Liu J, et al. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal [J]. Oncogene, 2011, 30(47): 4707-4720.
- [5] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. Cell, 2004, 117(7): 927-939.
- [6] Ai L, Kim WJ, Alpay M, et al. TRIM29 suppresses TWIST1 and invasive breast cancer behavior [J]. Cancer Res, 2014, 74(17): 4875-4887.
- [7] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [8] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.
- [9] Jin F, Zhao L, Zhao HY, et al. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes [J]. Neuroscience, 2008, 154(2): 541-550.
- [10] Bora-Singhal N, Perumal D, Nguyen J, et al. Gli1-mediated regulation of Sox2 facilitates self-renewal of stem-like cells and confers resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. Neoplasia, 2015, 17(7): 538-551.
- [11] Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(17): 2806-2812.
- [12] Liu AY, Cai Y, Mao Y, et al. Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24 [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(3): 537-545.

(收稿日期: 2015-06-15)

(本文编辑: 宗贝歌)