

TM9SF2 促进三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖与转移

王丽新^{1,2}, 姜修博^{2,3}, 郭巧珍², 王籽橙², 王 勃², 王玉霞², 瞿文生^{2*}, 段小涛^{2**}

(¹天津大学化工学院, 天津 300350; ²军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850;
³南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 211800)

摘 要 探究 9 次跨膜超家族蛋白 2(transmembrane 9 superfamily protein member 2, TM9SF2) 对于三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和转移的影响及其分子机制。采用 Western blot 实验检测三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和非致瘤的乳腺上皮细胞株 MCF-10A 中 TM9SF2 蛋白表达的情况; 对高表达 TM9SF2 的三阴性细胞株 MDA-MB-231 进行基因沉默; 采用 MTS 法检测细胞增殖活性, 采用 Transwell 实验和划痕实验检测细胞的转移能力; 采用 Western blot 实验检测细胞内增殖相关蛋白 (PI3K、AKT、SRC 和 ERK) 和转移相关蛋白 (Snail、Slug 和 N-cadherin) 的表达情况。Western blot 实验证明, MDA-MB-231 中 TM9SF2 蛋白的表达量高于 MCF-10A 细胞。与对照组相比, siRNA-TM9SF2 转染组 TM9SF2 蛋白表达下调, 细胞增殖活性降低, 细胞转移能力减弱, PI3K、Snail、Slug 和 N-cadherin 表达水平均降低, AKT 蛋白磷酸化激活降低。研究结果表明, TM9SF2 基因能促进三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和转移。

关键词 TM9SF2; MDA-MB-231; 基因沉默; 增殖; 转移

中图分类号 R73-37 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)05-0609-05

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210514

引用本文 王丽新, 姜修博, 郭巧珍, 等. TM9SF2 促进三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖与转移[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(5): 609–613.

Cite this article as: WANG Lixin, JIANG Xiubo, GUO Qiaozhen, *et al.* TM9SF2 promotes proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(5): 609–613.

TM9SF2 promotes proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231

WANG Lixin^{1,2}, JIANG Xiubo^{2,3}, GUO Qiaozhen², WANG Zicheng², WANG Bo², WANG Yuxia², QU Wensheng^{2*}, DUAN Xiaotao^{2**}

¹School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350; ²State Key Laboratory of Antitoxic Drugs and Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; ³College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing, 211800, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of transmembrane 9 superfamily protein member 2 (TM9SF2) in proliferation and migration of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. The expression of TM9SF2 in triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 and nontumorigenic mammary epithelial cell line MCF-10A were measured by Western blot. MDA-MB-231 cells were treated with siRNA-TM9SF2 to knock-down the expression of TM9SF2. The effect of silencing TM9SF2 was measured with Western blot. The proliferation of cells was tested by MTS, and the migration was measured with Transwell and wound-healing assay. Proteins related to proliferation (PI3K, AKT, SRC and ERK) and migration (Snail, Slug and N-cadherin) were measured with Western blot. Protein expressions of TM9SF2 was better improved in triple negative breast cancer MDA-MB-231 cell line than MCF-10A. Compared with the control group, the siRNA-TM9SF2 infected group had lower expressions of PI3K, Snail, Slug and N-cadherin, and at the same time phosphorylation of AKT was decreased. The results suggest TM9SF2 can promote the proliferation and metastasis of triple negative breast

收稿日期 2021-02-23 通信作者 *Tel: 010-66930750 E-mail: quws2000@sina.com

**Tel: 18910646626 E-mail: duan_xt@hotmail.com

cancer MDA-MB-231 cell line.

Key words TM9SF2; MDA-MB-231; gene silence; proliferation; migration

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国占比恶性肿瘤的7%~10%,并呈逐年上升趋势。到2020年,乳腺癌的新增病例数达到了270万^[1]。乳腺癌主要分为三阴性、HER2/neu阳性、Luminal A和Luminal B 4种亚型^[2]。乳腺癌的转移是导致患者预后不良的重要因素。现在已知的乳腺癌转移类型有如下3种:局部扩展、淋巴转移、血运转移。目前针对转移并无特效治疗手段,因此,寻找新的控制乳腺癌转移的关键基因,掌握特定蛋白在乳腺癌转移中的作用机制,明确转移相关的分子靶标,对于乳腺癌临床治疗具有重要意义。

9次跨膜超家族蛋白2(transmembrane 9 superfamily protein member 2, TM9SF2)具有9个跨膜结构域,在整个进化过程中保守^[3-4],研究表明TM9蛋白可能在吞噬、黏附和营养吸收中发挥关键作用^[5-7],其中TM9SF1的表达与膀胱癌呈正相关^[8],TM9SF4的过表达与肿瘤转移表型正相关^[9-11]。TM9SF2在各种分型的乳腺癌(MCF-7、T-47D、SK-BR-3、ZR-75-1、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-134)细胞系中均有表达,而在正常细胞中表达量较低^[12]。通过对肿瘤基因组图谱数据(TCGA)进行分析,约35%的大肠癌患者TM9SF2的mRNA水平升高^[13]。另有研究发现,长的基因间非编码RNA 01232(LINC01232)通过调节TM9SF2在胰腺癌中发挥致癌活性^[14]。通过乳腺癌整合数据分析平台(breast cancer integrative platform, BCIP)分析TM9SF2 mRNA的表达水平在癌旁组织和乳腺癌组织中的差异,结果发现TM9SF2的mRNA水平在肿瘤细胞中的表达量比在正常细胞中高^[15]。本研究对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞株中TM9SF2的蛋白表达水平进行检测,并通过靶向沉默TM9SF2,探究TM9SF2对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖和转移能力的影响,并进一步探讨了TM9SF2调控三阴性乳腺癌的分子机制。

1 材料

1.1 试剂

DMEM培养基(德国Sigma公司);胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Gibco公司);Lipo-

fectamine-iMAX(美国Invitrogen公司);苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(Phos-top)(美国Selleck公司);Bradford蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司);兔抗人TM9SF2(美国Abcam公司);兔抗人Snail、Slug、N-cadherin、PI3K、p-AKT、ERK、SRC、GAPDH、兔二抗(美国CST公司)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF,美国Millipore公司)。

1.2 仪器

酶标仪、细胞培养箱、水平离心机、高速低温离心机(美国Thermo公司);显微图像采集系统、电泳仪、电转仪(美国Bio-Rad公司);微量移液器(德国Eppendorf公司)。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、非致瘤的乳腺上皮细胞株MCF-10A购自美国模式培养物集存库(ATCC),由军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所保存。

2 方法

2.1 siRNA合成

本研究用到的siRNA的核酸序列如表1所示,由广州锐博生物科技有限公司进行设计并合成。

Table 1 siRNA Sequence

siRNA	Nucleic acid sequence (5'→3')
siTM9SF2-1	GCTTCGAGGAAGATGATAAGA
siTM9SF2-2	GACACTG CACAAAGATATT
siTM9SF2-3	ATATTCCGTCCTCCAAGAAA

2.2 细胞培养

用DMEM完全培养基(含有10%胎牛血清和1%青链霉素)在37℃、5%CO₂的培养箱内培养细胞,细胞融合率达90%及以上,用胰蛋白酶消化,人乳腺癌细胞株MDA-MB-231的传代比例一般为1:3,非致瘤的乳腺上皮细胞株MCF-10A一般按照1:2的比例传代。

2.3 敲低TM9SF2基因

将MDA-MB-231细胞以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种于6孔板,每孔2 mL,置于细胞培养箱中培养12 h,待细胞融合率达35%左右,对MDA-MB-231细胞进行转染实验。将转染试剂Lipo-

fectamine-iMAX 4 μL 与opti-MEM培养基100 μL 混合,同时将2 $\mu\text{mol/L}$ siRNA储存液加入opti-MEM 100 μL 混合,5 min后,将两者混匀,室温放置15 min后滴加到相应孔板中,培养6 h后换培养液,48 h后可进行后续实验。

2.4 MTS法检测增殖活性

MDA-MB-231细胞经siRNA转染48 h后,进行消化,再用DMEM完全培养基混悬,对每组转染序列的细胞进行计数,并调整每组细胞的浓度为每毫升 1×10^5 个细胞,接种到96孔板进行细胞培养,每孔加细胞悬液100 μL ,摇晃孔板使细胞分布均匀,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下进行培养,在接种后的12,24,48,72,96 h,每孔细胞加入MTS溶液20 μL ,轻晃使其分布均匀,继续37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内孵育培养2 h,酶标仪检测570 nm波长处的吸收度,根据吸收度制作细胞的对数期生长曲线。

2.5 Transwell小室侵袭实验检测转移能力

MDA-MB-231细胞经siRNA转染48 h后,进行消化,再用无血清DMEM培养基混悬,对每组转染序列的细胞进行计数,并调整每组细胞的浓度为每毫升 2.5×10^4 个细胞,在Transwell小室的下层孔中加入DMEM完全培养基800 μL ,在上室加入混匀的细胞悬液200 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养36~48 h,用4%多聚甲醛固定20 min,1%结晶紫染色1 h后,用棉签小心擦去膜上面的细胞,在显微镜下观察细胞染色情况,用显微图像采集系统进行拍照。

2.6 划痕愈合迁移实验检测转移能力

siRNA转染MDA-MB-231细胞48 h后,利用10 μL 枪头在细胞层中形成划痕,生理盐水洗去漂浮细胞,更换无血清培养基,于0 h,24 h在显微镜下观察细胞迁移情况,并随机选取3处进行拍照。每组转染序列设3个复孔。

2.7 Western blot实验检测相关蛋白的表达情况

MDA-MB-231细胞转染48 h后,收集细胞,用RIPA裂解液(含有PMSF、protease inhibitor cocktail、phostop)进行蛋白提取,加上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸15 min,用10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,再转印至PVDF膜上,将PVDF膜放在用TBST配制的含5%脱脂牛奶溶液中室温封闭1 h,再分别加入相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日以TBST洗涤3次,加入二抗,室温孵育1 h,TBST洗涤3次,定影显色,用

GAPDH作内参对照,检测不同转染组别的MDA-MB-231细胞的蛋白表达情况。

2.8 数据统计

实验数据使用Graph Pad Prism 5统计软件进行统计及图像处理。采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TM9SF2在MDA-MB-231细胞和MCF-10A细胞的表达量差异

体外培养三阴性细胞株MDA-MB-231以及非致瘤的乳腺上皮细胞株MCF-10A,采用Western blot检测细胞内TM9SF2蛋白表达情况,结果表明TM9SF2在MDA-MB-231中的表达量明显高于MCF-10A(图1)。结果证明,TM9SF2在恶性和转移程度都较高的MDA-MB-231中高表达。

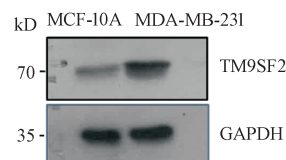


Figure 1 MCF-10A cells had lower expression of TM9SF2 than MDA-MB-231 cells

3.2 敲低TM9SF2的效率验证

用siNC、siTM9SF2(1、2、3序列)转染乳腺癌细胞MDA-MB-231,细胞转染48 h后,Western blot检测结果(图2)显示,与对照组相比,转染了siTM9SF2(1、2、3序列)的细胞中TM9SF2的蛋白表达水平明显下调。

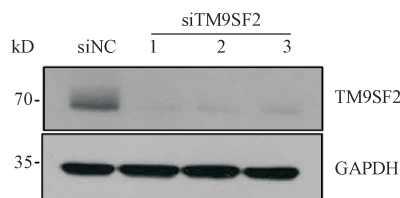


Figure 2 Gene silencing efficiency in MDA-MB-231 cells
siNC: siRNA-Negative control; siRNA sequence: siTM9SF2-1: GCTTC-GAGGAAGATGATAAGA; siTM9SF2-2: GACACTGCACAAAGATA-TTG; siTM9SF2-3: ATATTCCGTCTCCAAGAAA

3.3 敲低TM9SF2对细胞增殖能力的影响

MTS检测结果显示:在细胞贴壁的0、24、48、72和96 h用MTS试剂盒检测细胞增殖活性,敲低TM9SF2的细胞增殖活性明显低于对照组(图3),提

示敲低TM9SF2抑制MDA-MB-231的增殖能力。

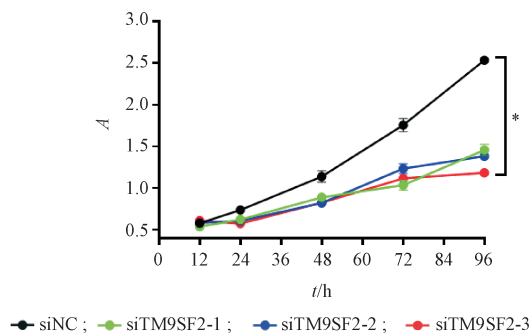


Figure 3 Effects of silencing the TM9SF2 gene on proliferation of MDA-MB-231 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

*** $P < 0.001$ vs siNC group

3.4 敲低TM9SF2对细胞转移能力的影响

Transwell实验结果显示,敲除TM9SF2的细胞转移数显著减少(图4-A),差异有统计学意义(图4-B)。划痕实验结果显示,与对照组相比,敲低TM9SF2的细胞划痕间隙变化降低(图4-C)。

3.5 敲低TM9SF2后相关信号通路的变化

Western blot实验结果显示,与对照组比较,敲低TM9SF2可下调PI3K蛋白表达;并影响AKT蛋白磷酸化激活(图5-A),而对于SRC与ERK通路影响较小。提示TM9SF2主要通过PI3K-AKT通路,调控三阴性乳腺癌的增殖。敲低TM9SF2后Snail、Slug和N-cadherin在蛋白水平表达均出现明显下调(图5-B),这些是EMT通路的重要转录因子和相关蛋白,由此表明敲低TM9SF2影响EMT过程进而

影响MDA-MB-231的转移。

4 讨论

本实验通过对高表达TM9SF2的MDA-MB-231细胞进行基因沉默,检测细胞增殖和转移能力的变化,结果表明,TM9SF2在MDA-MB-231细胞中发挥了促进增殖和转移的作用。接下来的实验可以采用Transwell小孔铺人工基底膜胶(Matrigel)进一步检测TM9SF2是否对MDA-MB-231细胞的侵袭产生影响。实验后续通过对其分子机制的研究,发现敲低TM9SF2可下调PI3K的表达,抑制下游AKT磷酸化的发生,但并不显著影响SRC和ERK的表达。PI3K-AKT信号通路在多种细胞功能(例如细胞存活、生长、增殖和代谢)中起着至关重要的作用,在许多人类肿瘤中均被异常激活^[16]。TM9SF2特异性通过PI3K-AKT通路影响三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231的增殖。由此说明可以通过降低TM9SF2的表达来抑制三阴性乳腺癌的增殖。但是具体通过PI3K-AKT通路的哪个分子对增殖产生影响并未十分明确,而且PI3K-AKT也会对肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等过程产生影响,所以对TM9SF2促进肿瘤增殖的具体分子机制还有待进一步的探究。Western blot实验结果还证明,TM9SF2通过上调EMT通路的重要转录因子Snail、Slug和通路的相关蛋白N-cadherin来增强细胞的转移能力。因

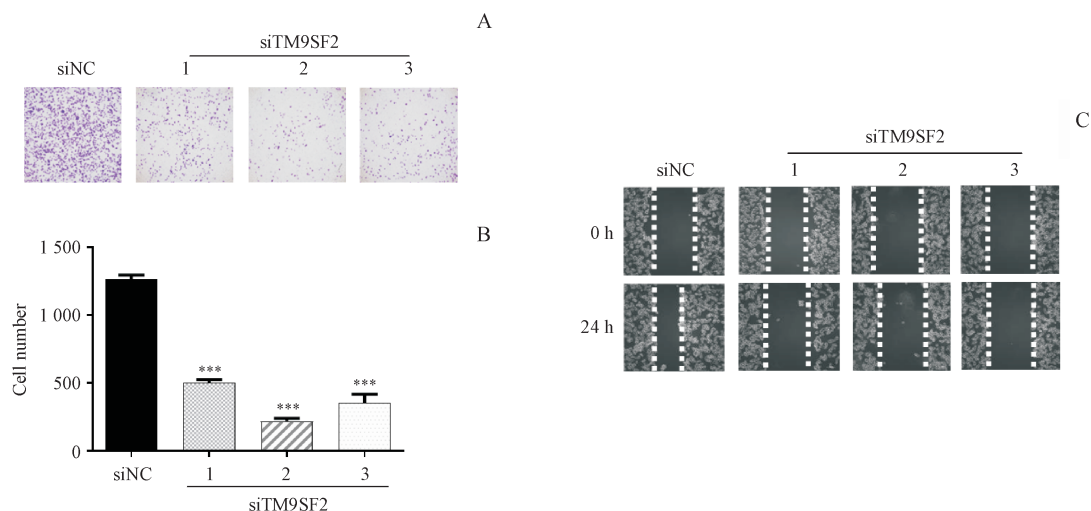


Figure 4 Effects of silencing TM9SF2 on migration in MDA-MB-231 cell lines

A: Transwell assay was implemented to test cell migration; B: Statistical analysis of Transwell assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$); C: Wound-healing assay was implemented to test cell migrating

*** $P < 0.001$ vs siNC group

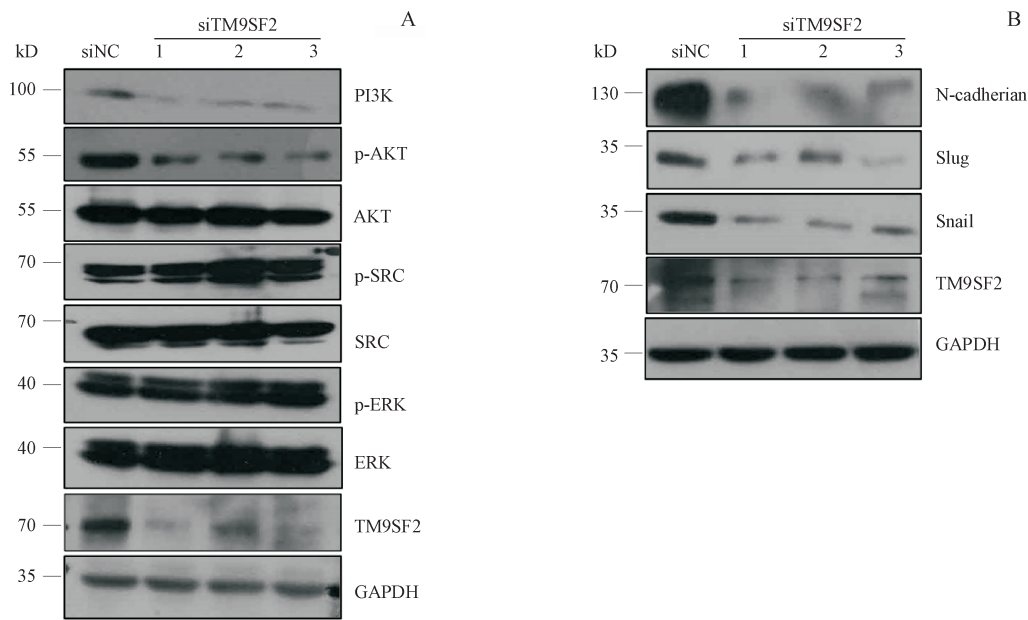


Figure 5 Effects of silencing the TM9SF2 gene on the expressions of protein related to proliferation(A) and metastasis(B) in MDA-MB-231 cell lines
A: Protein related to proliferation; B: Protein related to metastasis

此,通过抑制 TM9SF2 基因发挥生物作用可以减少三阴性乳腺癌细胞进行 EMT 过程,这一过程可能发生在肿瘤产生早期,因此通过对 TM9SF2 基因表达的控制有助于患者降低远端转移发生概率,从而提高患者预后的生存质量。

TM9SF2 调控三阴性乳腺癌的作用机制以及 TM9SF2 在肿瘤发生发展过程中起到的作用有待进一步深入研究。

References

- [1] Yeo SK, Guan JL. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor [J]. *Trends Cancer*, 2017, **3**(11):753-760.
- [2] Perrin J, Mortier M, Jacomin AC, et al. The nonspanins TM9SF2 and TM9SF4 regulate the plasma membrane localization and signalling activity of the peptidoglycan recognition protein PGRP-LC in *Drosophila* [J]. *Innate Immunity*, 2015, **7**(1):37-46.
- [3] Froquet R, Cherix N, Birke R, et al. Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and dictyostelium [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(11):6764-6762.
- [4] Cornillon S, Pech E, Benghezal M, et al. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**:34287-34292.
- [5] Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, et al. The human homologue of dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells [J]. *EMBO Rep*, 2009, **10**:1348-1354.
- [6] He P, Peng Z, Luo Y, et al. High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene [J]. *Autophagy*, 2009, **5**: 52-60.
- [7] Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer [J]. *PLoS One*, 2011, **6**:18135.
- [8] Fais S, Fauvarque M. TM9 and cannibalism: how to learn more about cancer by studying amoebae and invertebrates [J]. *Trends Mol Med*, 2012, **18**(1):4-5.
- [9] Sun L, Meng Z, Zhu Y, et al. TM9SF4 is a novel factor promoting autophagic flux under amino acid starvation [J]. *Cell Death Differ*, 2018, **25**(2):368-379.
- [10] Zhu Y, Xie M, Meng Z, et al. Knockdown of TM9SF4 boosts ER stress to trigger cell death of chemoresistant breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2019, **38**(29):5778-5791.
- [11] Samah AS, Yuh S, Tuoya DY, et al. Identification of TM9SF2 as a candidate of the cell surface marker common to breast carcinoma cells [J]. *Clin Oncol Cancer Res*, 2009, **6**:1-9.
- [12] Clark CR, Maile M, Blaney P, et al. Transposon mutagenesis screen in mice identifies TM9SF2 as a novel colorectal cancer oncogene [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1):153-157.
- [13] Li Q, Lei CB, Lu C, et al. LINC01232 exerts oncogenic activities in pancreatic adenocarcinoma via regulation of TM9SF2 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(10):608-612.
- [14] Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups [J]. *Nature*, 2012, **486**(7403):346-352.
- [15] Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, **170**(4):605-635.