

ABCG2 过表达对乳腺癌细胞上皮间质化能力的影响

聂伟¹, 王小毅^{2△}, 邱干¹, 蒋勇¹, 倪贵生¹

(1. 武警重庆总队医院甲乳血管外科 400061; 2. 重庆医科大学附属第一医院普外科 400016)

[摘要] **目的** 探讨三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ABCG2)过表达对乳腺癌细胞上皮间质转化(EMT)能力的影响。**方法** 构建 ABCG2 稳定过表达乳腺癌细胞株,检测 ABCG2 稳定过表达前后 MCF-7 乳腺癌细胞中 E-cadherin 蛋白和 N-cadherin 蛋白的表达情况。**结果** E-cadherin 蛋白表达在 ABCG2 过表达 MCF-7 乳腺癌细胞中明显低于常规 MCF-7 细胞($P < 0.05$),而 N-cadherin 蛋白表达在 ABCG2 过表达 MCF-7 乳腺癌细胞中明显高于常规 MCF-7 细胞($P < 0.05$)。**结论** ABCG2 过表达可以通过调控 EMT 相关蛋白的表达进而增强乳腺癌细胞的 EMT 能力,可能与乳腺癌的转移密切相关。

[关键词] 乳腺肿瘤;肿瘤转移;上皮间质化;三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3622-02

Influence of ABCG2 overexpression on epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cell

Nei Wei¹, Wang Xiaoyi^{2△}, Qiu Gan¹, Jiang Yong¹, Ni Guisheng¹

(1. Department of Thyroid Mammary and Cardiovascular Surgery, Chongqing Municipal Corps Hospital, Chongqing 400061, China; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To observe the influence on EMT of breast cancer cell caused by ABCG2 overexpression and to approach the mechanism about how ABCG2 to affect metastasis of breast cancer. **Methods** Stable ABCG2 overexpression breast cancer cell line was constructed, Western-blot was used for detection of expression of E-cadherin and N-cadherin before and after transfection to approach the mechanism. **Results** Expression of E-cadherin in ABCG2 overexpression MCF-7 breast cancer cell was much lower than normal MCF-7 breast cancer cell ($P < 0.05$). Expression of N-cadherin in ABCG2 overexpression MCF-7 breast cancer cell was much higher than normal MCF-7 breast cancer cell ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of ABCG2 increases the expressions of EMT associated proteins of breast cancer cell so as to promote the EMT of breast cancer cell. ABCG2 might play an important role in promoting the metastasis of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; neoplasm metastasis; EMT; ABCG2

远处转移是乳腺癌终末期的主要表现,并且是导致乳腺癌患者死亡的主要原因^[1-2]。虽然预防远处转移在乳腺癌治疗中的意义重大,但是乳腺癌远处转移的机制尚不明确。近期许多研究发现,肿瘤细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在乳腺癌的转移过程中起重要作用^[3]。三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(adenosine triphosphate-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)是被广泛证实与乳腺癌转移密切相关的细胞因子^[4],并有实验指出 ABCG2 与 EMT 关系密切^[5],所以假设 ABCG2 可以通过诱发 EMT 而诱发乳腺癌转移。本实验检测 ABCG2 过表达乳腺癌细胞中 EMT 相关蛋白的表达情况,进而探讨 ABCG2 与 EMT 的相关性及其是否可以通过诱发 EMT 而诱发乳腺癌转移。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂和细胞 慢病毒载体及相关试剂由上海生工提供。人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中科院上海细胞所。MCF-7 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养(PAA 公司)。PCR 相关试剂购自 Takara 公司;引物合成与测序(上海生工);ABCG2 抗体、E-cadherin 抗体和 N-cadherin 抗体(Santa Cruz 公司);GAPDH(中杉金桥)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体构建包装 根据 GenBank 中 ABCG2(NC_

0000014.12)的序列,设计引物 KL-ABCG2-F: 5'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC CCA CCA TGT CTT CCA GTA ATG TCG AAG-3', KL-ABCG2-R: 5'-TCA CCA TGG TGG CGA CCG GAG AAT ATT TTT TAA GAA ATA ACA-3'。慢病毒载体构建及包装由上海生工完成。

1.2.2 细胞转染 正常对数生长细胞于 6 孔板中培育。将慢病毒混合液按感染指数 10:1 加入细胞培养液中培养 6~8 h 后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再加入培养基继续培养 48 h,以免疫荧光显微镜观察转染效果。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 收集试验细胞提取总蛋白。蛋白裂解液凝胶电泳后行 PVDF 转膜,用 5% BSA 封闭 1 h 加一抗(1:1 000)孵育过夜,次日用二抗孵育后行 ECL 显色曝光。

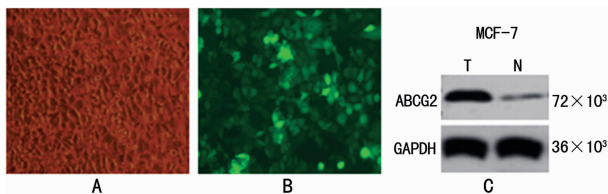
1.2.4 逆转录 PCR(RT-PCR)检测 PCR 引物 E-cadherin (141 bp): 5'-AAA CCT TGC CTT CTT TGT C-3', 5'-TTC CCA ACT CCT CTC CTG-3'。β-actin(300 bp): 5'-ACT GGT CTC AAG TCA GTG TAC AGG-3', 5'-ACA GGA AGT CCC TTG CCA TC-3'。N-cadherin(454 bp): 5'-CAG AAA ACT AAT TCC AAT CTG AAA-3', 5'-GCC ACC ATA TGA CTC CCT CTT AGT-3'。收取细胞放入离心管,加入 Tripure Reagent 裂解细胞。裂解液倒入离心管,分次加入氯仿、异丙醇、无

水乙醇和 75%DEPC 乙醇,剧烈振荡混匀后高速离心。倒掉上清液,取适量 RNA 样品进行 PCR 扩增(按 PCR 操作说明书进行)。然后进行凝胶电泳;电泳结束摄取电泳图。计算不同条带的灰度值,与内参灰度值进行对比,获得灰度比值。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

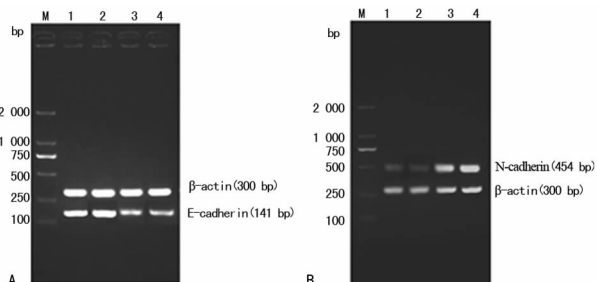
2.1 ABCG2 过表达乳腺癌细胞株的鉴定 慢病毒转染 48 h 后行免疫荧光观察,ABCG2 过表达的 MCF-7 细胞呈绿色荧光(图 1A、B)。ABCG2 过表达 MCF-7 乳腺癌细胞株中 ABCG2 蛋白含量(0.821 ± 0.061)明显高于常规 MCF-7 乳腺癌细胞中 ABCG2 蛋白含量(0.021 ± 0.006, $P < 0.05$)。见图 1C。



A、B: MCF-7 细胞转染后的免疫荧光观察(A: 可见光, B: 荧光观察, ×200); C: Western blot 检测 ABCG2 蛋白表达。

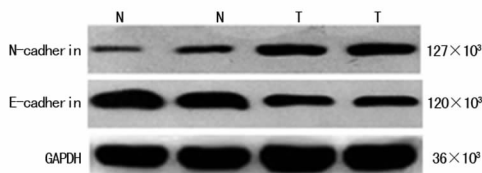
图 1 ABCG2 在 MCF-7 乳腺癌细胞中的表达

2.2 ABCG2 过表达和常规 MCF-7 乳腺癌细胞 E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 表达情况 构建 ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞株后,以常规 MCF-7 乳腺癌细胞作为对照组。用 RT-PCR 检测不同组中 E-cadherin 和 N-cadherin 的 mRNA 表达情况。结果显示: ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞 E-cadherin 的 mRNA 表达(0.321 ± 0.004)明显低于常规 MCF-7 乳腺癌细胞(0.814 ± 0.009, $P < 0.05$),见图 2A; ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞 N-cadherin 的 mRNA 表达(1.007 ± 0.089)明显高于常规 MCF-7 乳腺癌细胞(0.265 ± 0.007, $P < 0.05$),见图 2B。



A: E-cadherin mRNA 的检测; B: N-cadherin mRNA 的检测; 1 和 2 为常规 MCF-7 乳腺癌细胞, 3 和 4 为转染后 MCF-7 乳腺癌细胞。

图 2 ABCG2 过表达和常规 MCF-7 乳腺癌细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin mRNA 表达情况



N: 常规细胞, T: 转染细胞。

图 3 ABCG2 过表达前后 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白在 MCF-7 乳腺癌细胞中的表达情况

2.3 ABCG2 过表达和常规 MCF-7 乳腺癌细胞 E-cadherin 和

N-cadherin 蛋白表达情况 构建 ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞株后,以常规 MCF-7 乳腺癌细胞作为对照组。然后采用 Western blot 技术检测不同组中 E-cadherin 和 N-cadherin 的蛋白表达情况。结果显示: ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞 N-cadherin 的蛋白表达(0.356 ± 0.007)明显高于常规 MCF-7 乳腺癌细胞(0.117 ± 0.003, $P < 0.05$),见图 3; ABCG2 过表达的 MCF-7 乳腺癌细胞 E-cadherin 的蛋白表达(0.311 ± 0.007)明显低于常规 MCF-7 乳腺癌细胞(0.956 ± 0.017, $P < 0.05$),见图 3。

3 讨 论

转移是恶性肿瘤主要的特征性临床表现之一,并且是导致肿瘤患者死亡的主要原因^[6]。导致恶性肿瘤发生转移的机制尚不十分明确,但近期许多研究证实 EMT 在肿瘤转移过程中发挥着极其重要的作用^[3]。ABCG2 是于 1998 年发现的与乳腺癌耐药密切相关的跨膜转运蛋白^[7]。近期许多研究证实 ABCG2 与乳腺癌肿瘤干细胞的关系密切,而肿瘤干细胞与 EMT 及肿瘤转移关系密切^[8-9]。因此,推断 ABCG2 可能可以促进乳腺癌细胞发生 EMT,进而促进肿瘤转移。EMT 是多因子参与的复杂的分子生物学过程,其主要表现为上皮细胞发生间皮细胞样改变,参与 EMT 过程的因子主要包括上皮特异性因子和间质特异性因子^[10-12]。E-cadherin 是上皮细胞的一种主要功能蛋白,是最常见的上皮特异性因子之一,其作用主要是维持上皮细胞间的黏附能力; E-cadherin 的缺失可以使细胞间的相互黏附能力下降,进而导致肿瘤细胞获得更强大的活动和侵袭能力,促进肿瘤的浸润和转移^[13]。N-cadherin 主要表达于间质细胞,是间质细胞的特征性蛋白之一; 上皮细胞中出现 N-cadherin 的高表达证实上皮细胞已经获得了间质细胞的特性,获得了更强大的活动和侵袭能力,容易发生浸润和转移^[14]。因此,本文选择 E-cadherin 和 N-cadherin 作为检测肿瘤细胞发生 EMT 的指标,拟探讨 ABCG2 蛋白是否可以通过促进 EMT 进而促进乳腺癌转移。

综上所述,通过慢病毒转染成功建立 ABCG2 过表达乳腺癌细胞,并且 ABCG2 过表达可以明显降低乳腺癌细胞中 E-cadherin 蛋白的表达($P < 0.05$),同时 ABCG2 过表达可以明显升高乳腺癌细胞中 N-cadherin 蛋白的表达($P < 0.05$)。证实 ABCG2 过表达可以促进乳腺癌细胞发生 EMT,进而促进肿瘤转移,但具体机制尚不明确。许多研究证实 ABCG2 可以通过多种信号通路参与肿瘤转移,如 Notch 信号通路, Hedgehog 信号通路, PI3K-AKT 信号通路等^[15-17],但其具体作用机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Downs-Holmes C, Silverman P. Breast cancer: overview & updates[J]. Nurse Pract, 2011, 36(12): 20-26.
 [2] Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): e279-289.
 [3] Burgess DJ. Breast cancer: Circulating and dynamic EMT [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(3): 148.
 [4] Xiang L, Su P, Xia SJ, et al. ABCG2 is associated with HER-2 Expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma[J]. Diagnostic Pathology, 2011, 6(90): 1-7.
 [5] Mato E, González C, Moral A, et al. ABCG2/(下转第 3626 页)

能障碍,其机制可能与减轻异氟醚对海马神经元 LTP 的损伤有关。

参考文献

- [1] Baer GA, Paloheimo M, Randell T. Postoperative cognitive dysfunction in the elderly surgical patient[J]. *Bri J Anaesth*, 1999, 82(5): 812-813.
 - [2] 王强,熊利泽. 电针预处理脑保护的研究进展. *国际麻醉与复苏杂志*, 2011, 32(5): 597-603.
 - [3] 徐浩,沈剑,赵昱,等. 电针预处理大鼠百会穴对脑缺血保护作用及 HIF-1 α 相关机制的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(5): 617-622.
 - [4] Zarnowska ED, Rodgers FC, Oh I, et al. Etomidate blocks LTP and impairs learning but does not enhance tonic inhibition in mice carrying the N265M point mutation in the beta3 subunit of the GABA(A) receptor[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 93(2): 171-178.
 - [5] 王东,张旭,杨天德,等. Orexin-A 对氯胺酮麻醉老年大鼠学习记忆及基底前脑 ChAT 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(15): 1885-1887.
 - [6] Tan CB, Ng J, Jeganathan R, et al. Cognitive changes after surgery in the elderly: does minimally invasive surgery influence the incidence of postoperative cognitive changes compared to open colon surgery? [J]. *Dem Geriatr Cognit Dis*, 2015, 39(3/4): 125-131.
 - [7] Consultant JS, Consultant LSR. Peri-operative cognitive dysfunction and protection [J]. *Trends Anaesth Critic Care*, 2016, 71(Suppl6): 436-443.
 - [8] Zhang B, Tian M, Zhen Y, et al. The effects of isoflurane and desflurane on cognitive function in humans[J]. *Anesthesia analgesia*, 2012, 114(2): 410-415.
 - [9] Tao G, Xue Q, Luo Y, et al. Isoflurane Is More Deleterious to Developing Brain Than Desflurane: The Role of the Akt/GSK3 β Signaling Pathway [J]. *Bio Med Res Int*, 2016: 7919640.
 - [10] 尹正录,孟兆祥,林舜艳,等. 穴位电刺激对高龄患者术后认知功能及炎症因子的影响[J]. *中华针灸电子杂志*, 2015, 4(4): 159-163.
 - [11] 朱俊超,杨延超,滕秀飞,等. 甲强龙联合经皮穴位电刺激对老年患者术后认知功能的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2016, 45(3): 233-235.
 - [12] Ballesteros KA, Sikorski A, Orfila JE, et al. Effects of inhaled anesthetic isoflurane on long-term potentiation of CA3 pyramidal cell afferents in vivo[J]. *Inter Gene Med*, 2012(5): 935-942.
 - [13] 刘媛媛,闵苏. 长时程增强及长时程抑制与全麻药关系的研究进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2009, 30(6): 548-550.
 - [14] 苏志伟,贾爱芬,吴中秋,等. 浅谈益肾通督法治治疗认知功能障碍的思路与方法[J]. *河北中医药学报*, 2010, 25(3): 34-34.
 - [15] 郑琦. 益肾调督针法治治疗脑卒中后轻度认知功能障碍的临床研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- (收稿日期: 2016-02-19 修回日期: 2016-04-06)
-
- (上接第 3623 页)
- BCRP gene expression is related to epithelial-mesenchymal transition inducer genes in a papillary thyroid carcinoma cell line (TPC-1) [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 5252(3): 289-300.
- [6] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis; Molecular Insights and Evolving Paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292.
 - [7] Ni ZL, Bikadi Z, Rosenberg MF, et al. Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) [J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11(7): 603-617.
 - [8] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy [J]. *Life Sci*, 2010, 86(17/18): 631-637.
 - [9] Adrian B, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma [J]. *Cancer Metastasis*, 2012, 31(1-2): 285-293.
 - [10] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 75-90.
 - [11] Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases [J]. *Breast Cancer Res*, 2003(5): 217-222.
 - [12] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 4125-4133.
 - [13] Med DR, Aydin F, Flügen G, et al. Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT); The role of E-cadherin transcription regulators SIP1, Twist and Snail in colorectal adenomas [J]. Springer Berlin Heidelberg, 2009, 38(8): 245-246.
 - [14] Rai H, Ahmed J. N-Cadherin; A Marker Of Epithelial To Mesenchymal Transition In Tumor Progression [J]. *Inter J Oncol*, 2014, 10(1): 55-61.
 - [15] Bhattacharya S, Das A, Mallya K, et al. Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(15): 2652-2662.
 - [16] Singh RR, Kunkalla K, Qu C, et al. ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Oncogene*, 2011, 30(49): 4874-4886.
 - [17] Goler-Baron V, Sladkevich I, Assaraf YG. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(10): 1340-1348.
- (收稿日期: 2016-02-12 修回日期: 2016-04-06)