

· 论 著 ·

shRNA 靶向沉默 CNTN1 表达对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 凋亡及迁移侵袭的影响

贺赛¹, 田艳超², 耿洁³, 陈楠¹, 杨晓民¹, 侯艳妮¹, 范拥国¹, 赵静¹, 杨维霞⁴

1. 陕西省肿瘤医院乳腺病院, 陕西 西安 710061; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院烧伤整形科, 吉林 长春 130062;
3. 西安交通大学第二附属医院心内科, 陕西 西安 710004; 4. 通用环球西安西航医院检验科病理室, 陕西 西安 710021

摘要: **目的** 探讨短发夹 RNA (shRNA) 靶向沉默接触蛋白-1 (CNTN1) 基因表达对人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞凋亡及迁移侵袭能力的影响及其机制。**方法** 将人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞株分为 3 组: 常规更换培养基的为空白组, 转染无义 shRNA 片段的为空载体组, 转染靶向沉默 CNTN1 表达的 shRNA 载体片段的为沉默组。采用 western blot 法检测 CNTN1 蛋白的表达水平。通过流式细胞技术、细胞划痕以及 Transwell 实验分别检测凋亡率和迁移、侵袭能力的改变, 采用 western blot 法检测细胞中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和上皮细胞间质化相关基因蛋白 [锌指 E 盒结合蛋白 1 (ZEB-1)、波形蛋白 (Vimentin)、扭曲蛋白 (Twist)、锌指转录因子 (Snail)] 的表达情况。**结果** 与空白组和空载体组比较, 沉默组 MDA-MB-468 细胞中 CNTN1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 凋亡率增加 ($P < 0.05$), 迁移和侵袭能力均明显减弱 ($P < 0.05$), ZEB-1、Vimentin、Twist 和 Snail 的表达水平明显被抑制, 而 E-cadherin 表达水平明显升高。**结论** 沉默 CNTN1 表达可通过调节上皮细胞间质转化促进乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 凋亡增加, 迁移和侵袭能力减弱。

关键词: 乳腺癌; MDA-MB-468; 接触蛋白-1 基因; 细胞凋亡; 迁移; 侵袭; 短发夹 RNA

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2022)09-1211-05

Effects of shRNA targeted silencing of CNTN1 expression on apoptosis, migration and invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-468

HE Sai*, TIAN Yan-chao, GENG Jie, CHEN Nan, YANG Xiao-min, HOU Yan-ni, FAN Yong-guo, ZHAO Jing, YANG Wei-xia

* Breast Hospital of Shaanxi Cancer Hospital, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Corresponding author: YANG Wei-xia, E-mail: jsjyy886@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of short hairpin RNA (shRNA) targeted silencing of CNTN1 gene expression on apoptosis, migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-468 cells and its mechanism. **Methods** Human breast cancer MDA-MB-468 cell lines were divided into three groups: blank group replaced with routine culture medium, empty vector group transfected with nonsense shRNA fragment, and silencing group transfected with shRNA vector fragment targeting silencing CNTN1 expression. The expression level of CNTN1 protein was detected by western blot. The changes of apoptosis rate, migration and invasion ability were detected by flow cytometry, cell scratch and transwell experiment. Western blot was used to detect the expressions of E-cadherin, and epithelial interstitial related genes [zinc finger E-box binding protein 1 (ZEB-1), Vimentin, Twist protein, zinc finger transcription factor (Snail)]. **Results** The expression level of CNTN1 protein in MDA-MB-468 cells in the silencing group decreased significantly ($P < 0.05$), the apoptosis rate increased ($P < 0.05$), and the ability of migration and invasion decreased significantly ($P < 0.05$). The expression levels of ZEB-1, Vimentin, Twist and Snail in the silencing group were significantly inhibited, while the expression level of E-cadherin increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing CNTN1 expression promotes the increase of apoptosis and the decrease of migration and invasion of breast cancer cell line MDA-MB-468 by regulating epithelial mesenchymal

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.09.006

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2021SF-218); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2020JM-680); 陕西省肿瘤医院院内国家自然科学基金孵育项目 (SC211007)

通信作者: 杨维霞, E-mail: jsjyy886@163.com

出版日期: 2022-09-20

transformation.

Keywords: Breast cancer; MDA-MB-468; CNTN1; Apoptosis; Migration; Invasion; Short hairpin RNA

Fund program: Key Research and Development Plan of Shaanxi Province (2021SF-218); Shaanxi Natural Science Basic Research Plan (2020JM-680); Incubation project of National Natural Science Foundation in Shaanxi Cancer Hospital (SC211007)

乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤首位^[1]。由于早期诊断缺乏特异性,约30%~40%的乳腺癌患者首诊时已处于中晚期^[2],预后往往较差,因此早诊早治对于改善乳腺癌患者预后具有重要意义^[3]。接触蛋白-1(contacin-1, CNTN1)基因因被发现与多种肿瘤的发生发展相关而被关注^[4-7],然而其在乳腺癌中的功能如何却鲜有报道。本实验通过沉默CNTN1表达,观察乳腺癌细胞凋亡及迁移侵袭能力的变化,并对其影响机制进行初步探讨,为乳腺癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人乳腺癌MDA-MB-468细胞株由本课题组冻存。鼠抗人Snail、ZEB-1、Vimentin、E-cadherin、Twist和CNTN1抗体购自Epitomics公司,鼠抗人 β -actin抗体、四唑氮蓝(MTT)、青链霉素双抗和BSA试剂购自Sigma公司。细胞凋亡试剂盒和Transwell小室均购自南京凯基生物科技有限公司。靶向沉默CNTN1表达的短发夹RNA(shRNA)载体(CNTN1 shRNA)和对照载体由美国Invitrogen公司构建。

1.2 细胞培养及分组 乳腺癌MDA-MB-468细胞培养于含双抗的DMEM培养液(pH值7.3、含10%胎牛血清)中,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中孵育。收集处于对数生长期的、状态良好的细胞进行实验^[8]。将细胞随机分为3组,空白组细胞进行常规更换培养基,空载体组细胞转染无义shRNA片段,沉默组转染CNTN1 shRNA片段。进行实验时各组实验均重复3次。

1.3 细胞转染 取生长状态良好的MDA-MB-468细胞接种于24孔板,加入去双抗的DMEM培养基,培养至细胞基本达到90%融合;使用Lipofectamine 2000™将CNTN1 shRNA或control shRNA质粒随机向细胞中转染,使用G418筛选单克隆细胞。

1.4 western blot Ripa裂解法提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,与5×SDS缓冲液混合,100℃5 min变性蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转PVDF膜20 V 40 min,含5%脱脂奶粉的TBS-T室温封闭1 h,

TBS-T液洗涤PVDF膜3次,分别加CNTN1一抗(1:2 000)、Snail一抗(1:1 000)、Vimentin一抗(1:1 000)、Twist一抗(1:1 000)、ZEB-1一抗(1:1 000)、E-cadherin一抗(1:1 000)和 β -actin一抗(1:2 000),4℃冰箱过夜;二抗(1:5 000)37℃孵育箱孵育1 h,ECL显影,凝胶成像系统扫描。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取生长状态良好的细胞,弃原上清,更换为新的DMEM培养基(不含胎牛血清),在细胞培养箱内继续孵育24 h,弃上清,经胰酶消化后,预冷的PBS液洗涤细胞2次,调整细胞浓度为 2.0×10^9 /L,按照膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)及碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒操作步骤,检测凋亡率,其中Annexin V-FITC⁺/PI⁻的细胞百分率代表早期细胞凋亡率,Annexin V-FITC⁺/PI⁺的细胞百分率代表晚期细胞凋亡率,二者之和为总凋亡率。

1.6 细胞划痕实验检测 细胞迁移能力将细胞接种于6孔板,培养至单层铺满后,弃上清,PBS液冲洗细胞表面3次,10 ml枪头尖端在6孔板细胞表面上垂直划痕,用PBS液冲洗2次,加入DMEM培养基(含1%胎牛血清)继续孵育。于0 h和24 h在倒置显微镜(×400)下观测并照相,测量划痕间距,计算迁移率,各组细胞均设2个复孔。

1.7 Transwell实验检测迁移、侵袭能力

1.7.1 迁移实验 DMEM培养基(无胎牛血清)调整细胞浓度至 2×10^5 个/ml,混匀后,取其中100 μ l加入Transwell小室上室,500 μ l DMEM培养基(含10%胎牛血清)加入Transwell小室下室,置于细胞孵育箱,培养48 h,取出Transwell小室,PBS淋洗3遍,用棉签小心擦去Transwell小室滤膜内层细胞后,将Transwell小室置于95%酒精中固定细胞,5 min后,4 g/L结晶紫染色,显微镜观察。随机选取5个视野,记录穿膜细胞数,平均值表示细胞的迁移能力,每组设2个复孔。

1.7.2 侵袭实验 使用50 mg/L的Matrigel与DMEM培养基按1:8配比稀释后,平铺于Transwell的PVP滤膜上,室温风干,紫外线照射消毒。用DMEM培养基(无胎牛血清)调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml,取其中200 μ l加入上室,下室加入500 μ l

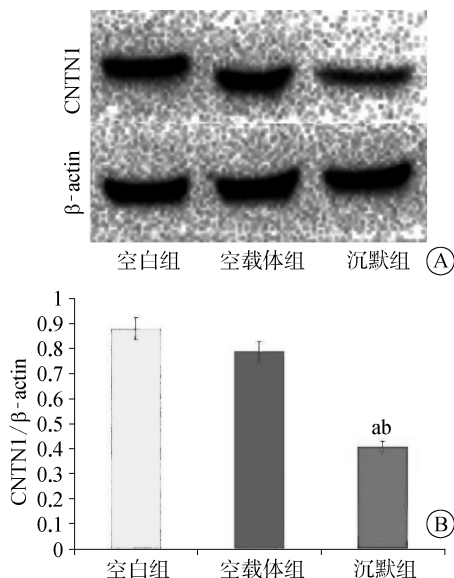
DMEM 培养基(提前加入 10% 胎牛血清),常规细胞培养箱中孵育 48 h,取出小室,擦去滤膜内层细胞,95% 酒精固定,4 g/L 结晶紫溶液染色,显微镜观察。随机选取不同象限共 5 个视野,拍照计数,取平均值表示侵袭能力。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA CNTN1 转染对 CNTN1 表达水平的影响 western blot 结果显示,沉默组 MDA-MB-468 细胞中的 CNTN1 蛋白表达水平明显低于空白组和空载体组 ($P < 0.05$),而空白组与空载体组中 CNTN1 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。MDA-MB-468 细胞在转染 shRNA CNTN1 后,其 CNTN1 表达量明显下降,表明低表达 CNTN1 的 MDA-MB-468 细胞获取成功。

2.2 shRNA CNTN1 对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响 通过流式细胞技术分析显示,沉默组 MDA-MB-468 细胞总凋亡率 [$(20.95 \pm 2.12)\%$] 较空白组 [$(8.45 \pm 1.52)\%$] 和空载体组 [$(7.22 \pm 1.24)\%$] 明显升高 ($P < 0.05$);而空白组与空载体组凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

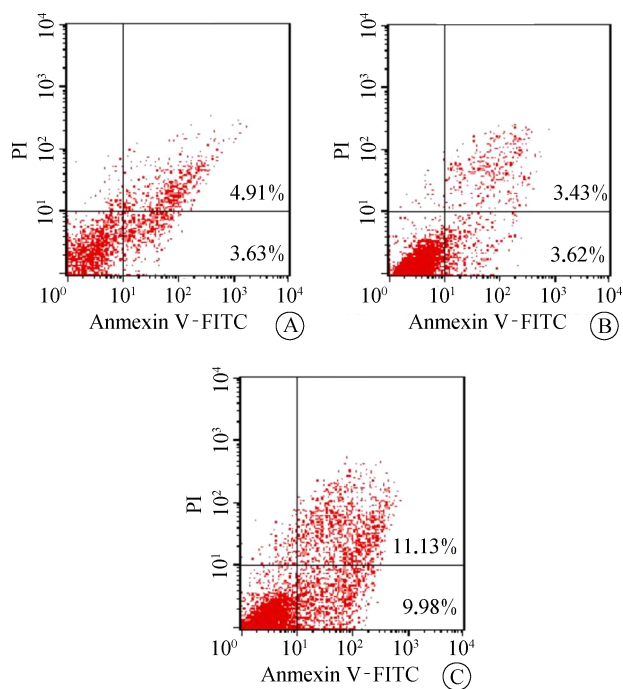


注:A为Western blot检测CNTN1的表达;B为CNTN1蛋白相对表达量;与空白组相比,^a $P < 0.05$;与空载体组相比,^b $P < 0.05$ 。

图1 shRNA CNTN1 转染对 CNTN1 表达水平的影响
Fig. 1 Effect of shRNA CNTN1 transfection on the expression level of CNTN1

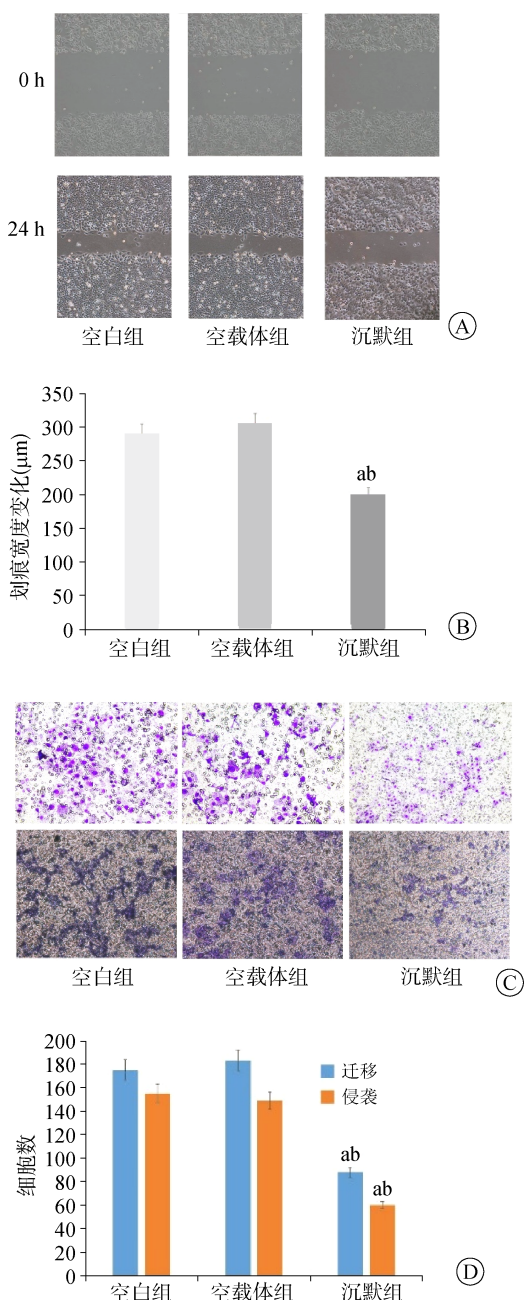
2.3 shRNA CNTN1 对 MDA-MB-468 细胞迁移和侵袭能力的影响 细胞划痕实验结果显示,沉默组较空白组和空载体组迁移率明显降低 ($P < 0.05$);而空白组与空载体组迁移率无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 3A、3B。Transwell 结果显示,沉默组迁移和侵袭细胞数均明显减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而空白组与空载体组迁移及侵袭细胞数未见明显差异 ($P > 0.05$)。见图 3C、3D。

2.4 shRNA CNTN1 转染对 MDA-MB-468 细胞内相关蛋白表达水平的影响 shRNA CNTN1 转染 MDA-MB-468 细胞后,行 Western blot 检测上皮细胞间质化 (EMT) 相关基因,结果(图 4)显示,沉默组 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达水平较空载体组和空白对照组明显升高,而上皮细胞间质化指标[指锌指 E 盒结合蛋白 1 (ZEB-1)、波形蛋白 (Vimentin)、扭曲蛋白 (Twist)、锌指转录因子 (Snail)] 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$),空白对照组和空载体组在 EMT 相关基因表达水平上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:A为空白组;B为空载体组;C为沉默组;左上象限为死亡细胞群 (FITC⁻/PI⁺),右上象限为晚期凋亡细胞群 (FITC⁺/PI⁺),右下象限为早期凋亡细胞群 (FITC⁺/PI⁻),左下象限为活细胞群 (FITC⁻/PI⁻)。

图2 沉默 CNTN1 表达对 MDA-MB-468 凋亡的影响
Fig. 2 Effect of silencing CNTN1 expression on MDA-MB-468 apoptosis



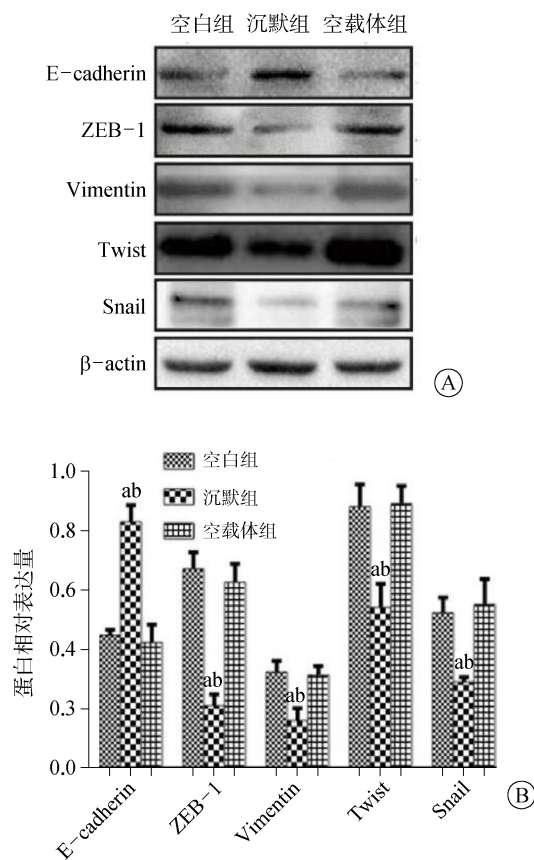
注: A 为细胞划痕实验($\times 200$); B 为各组细胞划痕实验迁移距离比较; C 为 Transwell 检测法迁移及侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$); D 为各组细胞迁移及侵袭细胞数;与空白组相比,^a $P < 0.05$;与空载体组相比,^b $P < 0.05$ 。

图3 shRNA CNTN1 转染对 MDA-MB-468 的迁移和侵袭能力的影响

Fig. 3 Effects of shRNA CNTN1 transfection on migration and invasion of MDA-MB-468 cells

3 讨论

乳腺癌目前发病率居女性恶性肿瘤首位^[1],并呈年轻化趋势^[9]。虽然随着乳腺癌综合治疗水平的提高、新药的研发等,乳腺癌预后已有明显改善^[10-11],但其早期诊治水平仍然较低。近年来,肿瘤基因治疗在乳腺癌诊疗中取得了长足进步,成为目



注: A 为 Western blot 检测 EMT 相关蛋白电泳图; B 为各组 EMT 相关蛋白的相对表达量;与空白组相比,^a $P < 0.05$;与空载体组相比,^b $P < 0.05$ 。

图4 shRNA CNTN1 转染对 MDA-MB-468 细胞内 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of shRNA CNTN1 transfection on expression of EMT-related proteins in MDA-MB-468 cells

前的研究热点^[12-13],但目前仍未能找到有效的靶点^[14]。

肿瘤的发生发展与基因表达异常关系密切。近年来,CNTN1 基因与肿瘤的关系逐渐被关注。有研究认为,CNTN1 基因过量表达参与了多种肿瘤的进展^[15]。Lamprianou 等^[16]发现 CNTN1 与口腔鳞状细胞癌及食管鳞状细胞癌的血管和淋巴管的生成以及淋巴道转移密切相关。Su 等^[17]发现 CNTN1 基因促进了不同类型肿瘤细胞的侵袭能力。Yu 等^[18]认为 CNTN1 对胃癌的诊疗以及预后判断有一定的指导价值。目前针对 CNTN1 在肿瘤中的研究相对较少^[19],在乳腺癌中的功能尚不明确。

在前期的工作中,本课题组已经对 CNTN1 基因与乳腺癌细胞部分功能的关系进行了初步探讨^[20]。为进一步明确 CNTN1 在乳腺癌细胞中的作用,本实验通过沉默乳腺癌 MDA-MB-468 细胞中 CNTN1 的表达,观察 MDA-MB-468 细胞凋亡和迁移侵袭能力的改变,对影响迁移及侵袭能力的机制进行初步探讨。本研究选择了人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 作为工

具细胞,因为笔者在预实验中发现,该基因在 MDA-MB-468 细胞中高表达,这满足笔者的要求。在转染 shRNA CNTN1 后,笔者首先通过 Western blot 对三组细胞(空白组、空载体组、沉默组)CNTN1 的表达量进行了鉴定,发现沉默组 MDA-MB-468 细胞中 CNTN1 表达量明显降低,证明成功构建了 CNTN1 低表达的靶细胞,为研究细胞功能改变奠定了基础。流式细胞技术提示,沉默组总凋亡率明显增加,提示沉默 CNTN1 促进了 MDA-MB-468 的凋亡。后续的研究显示沉默 CNTN1 表达后 MDA-MB-468 细胞迁移和侵袭能力均显著减弱,这是 CNTN1 基因表达抑制的结果。需要指出的是,笔者通过细胞划痕实验和 Transwell 实验两种方法对迁移能力进行了研究,二者结果一致。本研究证实 CNTN1 基因下调后,与细胞黏附有关的蛋白(E-cadherin)表达上升,而与细胞迁移及侵袭相关的蛋白(ZEB-1、Vimentin、Twist 和 Snail)表达则下降,提示 CNTN1 能促进乳腺癌细胞发生 EMT,最终提高乳腺癌细胞迁移和侵袭的能力。

通过本实验,进一步明确了沉默 CNTN1 表达可通过调节 EMT 促进乳腺癌 MDA-MB-468 细胞凋亡增加,迁移和侵袭能力减弱,为后续继续研究 CNTN1 基因在乳腺癌中的作用奠定了基础,同时或可为乳腺癌的治疗新靶点的发现提供理论参考。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Traves KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment[J]. Am Fam Physician, 2021, 104(2): 171-178.
- [2] Katsura C, Ogunmwoyoni I, Kankam HK, et al. Breast cancer: presentation, investigation and management [J]. Br J Hosp Med (Lond), 2022, 83(2): 1-7.
- [3] Li Y, Zhao X, Liu Q, et al. Bioinformatics reveal macrophages marker genes signature in breast cancer to predict prognosis [J]. Ann Med, 2021, 53(1): 1019-1031.
- [4] Wu HM, Cao W, Ye DX, et al. Contactin 1 (CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2012, 6(2): 265-270.
- [5] Doppler K, Schuster Y, Appeltshauser L, et al. Anti-CNTN1 IgG3 induces acute conduction block and motor deficits in a passive transfer rat model [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 73.
- [6] Çolakoğlu G, Bergstrom-Tyrberg U, Berglund EO, et al. Contactin-1 regulates myelination and nodal/paranodal domain organization in the central nervous system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(3): E394-E403.
- [7] Chen N, He S, Geng J, et al. Overexpression of Contactin 1 promotes growth, migration and invasion in Hs578T breast cancer cells [J]. BMC Cell Biol, 2018, 19(1): 5.
- [8] 贺赛,耿洁,杨晓民,等.shRNA 靶向沉默 CNTN1 表达抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 增殖及克隆形成能力 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(4): 564-568.
- [9] He S, Geng J, Yang XM, et al. shRNA silencing CNTN1 gene expression inhibits proliferation and clone formation of breast cancer MDA-MB-468 cells [J]. Modern Oncology, 2021, 29(4): 564-568.
- [9] Klassen CL, Gilman E, Kaur A, et al. Breast cancer risk evaluation for the primary care physician [J]. Cleve Clin J Med, 2022, 89(3): 139-146.
- [10] 薛南方,黄建军. 三阴性乳腺癌免疫检查点抑制剂治疗的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2021, 34(12): 1695-1699.
- [10] Xue NF, Huang JJ. Research progress of immune checkpoint inhibitors for triple negative breast cancer [J]. Chin J Clin Res, 2021, 34(12): 1695-1699.
- [11] 孙阳,安改丽,段兰英,等. HER2 嵌合抗原受体 T 细胞治疗乳腺癌的进展与展望 [J]. 中国临床研究, 2021, 34(8): 1113-1116.
- [11] Sun Y, An GL, Duan LY, et al. Progress and Prospect of HER2 chimeric antigen receptor T cells in the treatment of breast cancer [J]. Chin J Clin Res, 2021, 34(8): 1113-1116.
- [12] Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients [J]. Clin Chem, 2014, 60(1): 214-221.
- [13] Sang K, Yi TB, Huang XX, et al. miR-370-5p inhibits the progression of breast cancer via targeting LUC7L3 [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(5): 442-450.
- [14] Zhao N, Rosen JM. Breast cancer heterogeneity through the lens of single-cell analysis and spatial pathologies [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 82: 3-10.
- [15] Anderson C, Gerding WM, Fraenz C, et al. PLP1 and CNTN1 gene variation modulates the microstructure of human white matter in the corpus callosum [J]. Brain Struct Funct, 2018, 223(8): 3875-3887.
- [16] Lamprianou S, Chatzopoulou E, Thomas JL, et al. A complex between contactin-1 and the protein tyrosine phosphatase PTPRZ controls the development of oligodendrocyte precursor cells [J]. PNAS, 2011, 108(42): 17498-17503.
- [17] Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells [J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 209-223.
- [18] Yu JW, Wu SH, Lu RQ, et al. Expression and significances of contactin-1 in human gastric cancer [J]. Gastroenterol Res Pract, 2013, 2013: 210205.
- [19] 李宗熹,种姝伊,古丽米然·阿里同别克,等. 舒林酸衍生物 K-80003 与 MEK 抑制剂考比替尼联合用药对乳腺癌的效果研究 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 251-254.
- [19] Li ZX, Chong SY, Gulimiran A, et al. Effect of sulindac derivative K-80003 in combination with MEK inhibitor cobimetinib in breast cancer cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(2): 251-254.
- [20] 陈楠,贺赛,丁艳妮,等. CNTN1 基因对乳腺癌细胞株 Hs578T 增殖、迁移及侵袭能力的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(19): 3017-3020.
- [20] Chen N, He S, Ding YN, et al. Effects of recombinant plasmid of pEGFP-N1-CNTN1 on proliferation, clone formation, migration and invasion of Hs578T cells [J]. J Mod Oncol, 2016, 24(19): 3017-3020.

收稿日期:2022-06-21 修回日期:2022-07-09 编辑:叶小舟