

Oct4在乳腺癌组织中的表达及其对乳腺癌细胞侵袭性的影响

曹 勇¹ 张蕴蕴² 谢 佳¹ 曾晓华³ 吴诚义^{1*}

(¹重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆 400016; ²重庆医科大学附属第一医院肿瘤内科, 重庆 400016; ³重庆市肿瘤研究所, 重庆 400030)

摘要 探讨转录因子Oct4(octamer-binding transcription factor 4)在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌细胞侵袭性的影响。该研究选取27例乳腺癌组织病人的肿瘤组织及癌旁组织, 通过Western blot方法检测Oct4的蛋白水平。通过慢病毒介导的是shRNA干扰技术靶向沉默*oct4*基因的表达, Western blot方法验证*oct4*基因沉默效果。细胞划痕实验和细胞侵袭实验检测*oct4*沉默对细胞迁移及侵袭能力的影响。Western blot检测*oct4*沉默对上皮-间质转化(EMT)的多个标志物的影响。结果显示, 74%病人(20/27)中Oct4蛋白在乳腺癌组织的表达显著高于癌旁组织。慢病毒介导的shRNA能显著抑制细胞Oct4蛋白的水平。*oct4*基因沉默能抑制乳腺癌细胞的迁移及侵袭能力。*oct4*沉默后上皮细胞标志物E-cadherin、alpha-catenin明显上调; 而间质细胞标志物vimentin、N-cadherin则明显下降。以上结果表明, Oct4蛋白在乳腺癌组织的表达明显增高; *oct4*沉默可以显著抑制乳腺癌细胞的迁移及侵袭。

关键词 乳腺癌; 肿瘤细胞系; 肿瘤侵袭; Oct4

Expression of Oct4 in Breast Cancer Tissue and Its Effect on Cell Invasion of Breast Cancer

Cao Yong¹, Zhang Yunyun², Xie Jia¹, Zeng Xiaohua³, Wu Chengyi^{1*}

(¹Department of Endocrine Surgeons, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

³Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract This paper examined the expression level of Oct4 in breast cancer tissue and further investigate its effect on cell invasion of breast cancer. Western blot analysis was used to detect the protein level of Oct4 in 27 paired breast cancer tissue and adjacent non-tumoral breast tissue. *Oct4* expression in breast cancer cells was knock-down by lentivirus-mediated shRNA interference technology. The effect of *oct4* silencing on the cell invasion was determined by wound-healing assay and cell invasion assay. Four EMT markers (E-cadherin, alpha-catenin, vimen-

收稿日期: 2013-04-15 接受日期: 2013-05-14

重庆市科委攻关计划(批准号: CSTC2011AC5189)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-65075669, E-mail: 22566574@qq.com

Received: April 15, 2013 Accepted: May 14, 2013

This work was supported by the Key Projects of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.CSTC2011AC5189)

*Corresponding author. Tel: +86-23-65075669, E-mail: 22566574@qq.com

网络出版时间: 2013-07-25 14:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130725.1403.002.html>

tin and N-cadherin) were analyzed by Western blot analysis. The results demonstrated that 74% (20/27) patients showed elevated Oct4 expression in breast cancer tissue compared with that in adjacent non-tumoral breast tissue. Lentivirus-mediated shRNA significantly suppressed Oct4 expression. Gene silencing of *oct4* markedly inhibited invasion of breast cancer cells. Knockdown of *oct4* in breast cancer cells induced the expression of epithelial markers E-cadherin and α -catenin that was accompanied by a concomitant reduction of mesenchymal marker N-cadherin and vimentin. These finding suggested that Oct4 expression was upregulated in breast cancer tissue. Gene silencing of *oct4* inhibited cell invasion of breast cancer through regulating EMT.

Key words breast cancer; breast cancer cell line; cell invasion; Oct4

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,近年来有发病年轻及发病率上升的趋势,严重威胁着女性的健康。乳腺癌后期出现的全身系统性的转移是导致患者死亡的主要原因,也是目前临床治疗的瓶颈。因此,研究乳腺癌细胞的侵袭与转移,是目前乳腺癌研究领域的热点之一。

Oct4是一种在全能性胚胎细胞中表达的转录因子^[1],也是参与调控胚胎干细胞自我更新和维持其全能性的最为重要的转录因子之一^[2]。表达Oct4的细胞是具有潜在多能性的干细胞,这些细胞可能是引发肿瘤发生的靶细胞^[3-4]。目前已有研究报道,Oct4在调控乳腺癌细胞的增值及凋亡中发挥着重要作用^[5],然而关于其在肿瘤侵袭及迁移中的作用的报道还非常少。本研究检测了Oct4在肿瘤组织中的表达,并将表达靶向Oct4的慢病毒感染乳腺癌细胞,观察Oct4沉默对肿瘤细胞侵袭及迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞系MD-MBA-231购自ATCC(American Type Culture Collection)公司;表达针对Oct4及对照shRNA的慢病毒质粒载体pLKO.1-puro来自Sigma-Aldrich公司;慢病毒包被质粒pLP1、pLP2和pLP/VSVG来自于Invitrogen公司生产的BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System;Oct4的一抗(#2750)购自Cell Signaling Technology公司; β -actin(A5316)购自Sigma-Aldrich;E-cadherin(BS1098)、 α -catenin(BS2040)、N-cadherin(BS2224)、Vimentin(BS3182)购自Bioworld公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗兔IgG抗体购自GE healthcare公司;BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber(#354480)购自BD公司。

1.2 标本及处理

收集重庆市肿瘤医院2008年1月~2009年12月

乳腺癌手术切除标本27例,患者均为女性,术前行未行放化疗。将冰冻乳腺癌组织破碎后提取总蛋白。

1.3 细胞培养

MD-MBA-231细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL的DMEM培养基中,在含5% CO₂、37 °C孵箱中常规培养。

1.4 Western blot方法

裂解细胞后提取细胞的总蛋白后用BCA法测定蛋白浓度。取等量(50 μ g)蛋白上样,于10%的SDS-PAGE胶中分离蛋白后,以90 V电转膜4 h。转膜好的NC膜用5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗4 °C孵育摇床过夜, TBST洗膜,洗3次(每次5 min),二抗(1:3 000稀释)室温孵育2 h,用TBST洗膜后, ECL显影,以 β -actin为内参。

1.5 慢病毒介导的RNA干扰技术

将pLP1、pLP2、pVSVG及表达靶向Oct4 shRNA的质粒或对照shRNA经过磷酸钙转染法共转染HEK293T细胞,使细胞分泌高滴度的靶向Oct4 shRNA的慢病毒和表达对照shRNA的慢病毒作为对照。按照优化的感染条件将慢病毒感染生长状态良好的MD-MBA-231细胞。接种细胞到6孔细胞板,置于37 °C、5% CO₂培养箱培养,当细胞密度约70%时,用含有8 g/mL聚凝胺和2% FBS的细胞培养液稀释到相应滴度的病毒液进行感染。

1.6 细胞划痕实验

接种细胞到6孔细胞板中,每孔接种数为 8×10^6 。过夜培养后,用枪头尽量垂直的划细胞。PBS洗3次后加入无血清的培养基,20 h后取样,拍照。

1.7 细胞侵袭实验

将包被Matrigel的小室放入24孔板中,并于小室中加入DMEM培养基,置于37 °C、5% CO₂培养箱培养2 h。将细胞悬液(2.5×10^4)加入小室内侧,并于小室外侧加入培养基(含5% FBS)。将24孔板置于37 °C、

表1 27例乳腺癌病例资料

Tabel 1 The clinical data of 27 patients with breast cancer

年龄 Age	单纯癌 Carcinoma simplex	硬癌 Scirrhous carcinoma	浸润性导管癌 Breast invasive ductal carcinoma	浸润性小叶癌 Invasive lobular carcinoma	髓样癌 Medullary carcinoma	总计 Total
30~39	2	0	1	0	0	3
40~49	1	0	3	0	0	4
50~59	5	1	6	1	1	14
60~69	1	1	2	0	0	4
70~79	1	0	1	0	0	2
Total	10	2	13	1	1	27

5% CO₂培养箱培养22 h后, 固定细胞后用0.1%结晶紫染色。

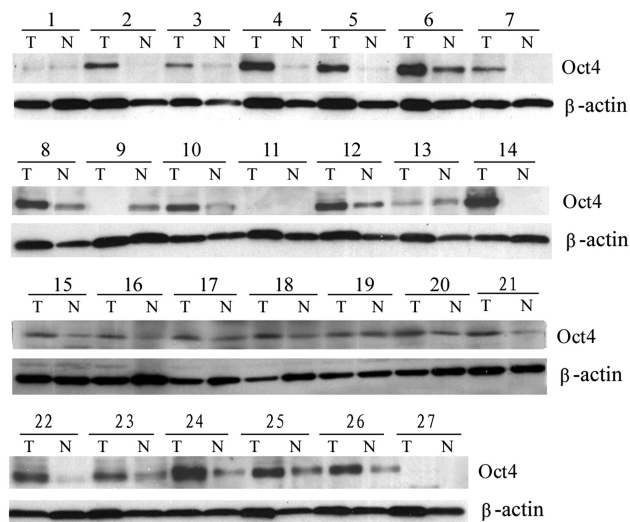
1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用SPSS 11.0统计软件进行统计学处理, 两样本均数比较用配对 t -test分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和癌旁组织中Oct4蛋白的表达水平

提取27位乳腺癌病人的肿瘤组织和癌旁组织中的总蛋白(病人资料见表1), 通过Western blot方



1-27: 病人号码; T: 乳腺癌组织; N: 癌旁组织。

1-27: patient number; T: breast cancer tissue; N: adjacent non-tumoral tissue.

图1 Western blot检测27对乳腺癌肿瘤组织和癌旁组织中Oct4蛋白的表达

Fig.1 Western blot analysis of Oct4 expression in breast cancer tissue and adjacent non-tumoral tissue in 27 pairs HCC patients

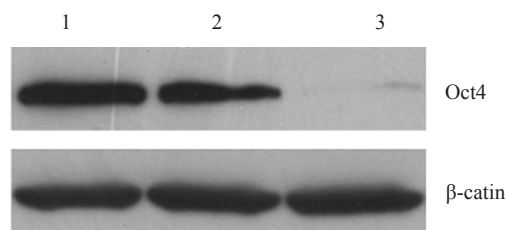
法, 我们发现20位(74%)病人肿瘤组织中Oct4的蛋白水平显著高于癌旁组织(图1)。以上结果显示, Oct4在乳腺癌组织中表达明显上调, 提示Oct4可能参与了乳腺癌的发生发展过程。

2.2 Western blot检测慢病毒介导的RNA干扰技术效果

在乳腺癌细胞MD-MBA-231感染表达shRNA-Oct4或shRNA-Control慢病毒, 转染72 h后提取细胞总蛋白进行Western blot检测。结果显示, shRNA-Oct4显著降低Oct4蛋白的表达, 成功地沉默了乳腺癌细胞中oct4基因的表达, 为下游实验打下了良好的实验基础(图2)。

2.3 Oct4沉默对乳腺癌细胞体外侵袭能力的影响

为了进一步研究Oct4对乳腺癌细胞表型的影响, 我们选择了具有侵袭性的乳腺癌细胞MD-MBA-231作为细胞模型。细胞划痕实验是一种简单易行的检测细胞运动的方法。通过细胞划痕实验, 我们发现划痕后20 h后, oct4基因沉默的肿瘤细胞的转移能力显著降低, 划痕愈合较慢(图3)。为了进一



1: 空白对照; 2: shRNA-control; 3: shRNA-Oct4。

1: blank; 2: shRNA-control; 3: shRNA-Oct4.

图2 Western blot检测表达靶向Oct4 shRNA的慢病毒的感染效果

Fig.2 Western blot analysis of Oct4 expression in cells infected with lentivirus expressing shRNA-Oct4 or shRNA-control

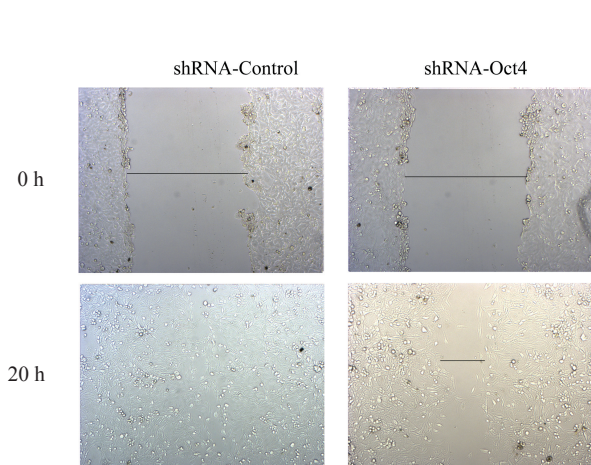
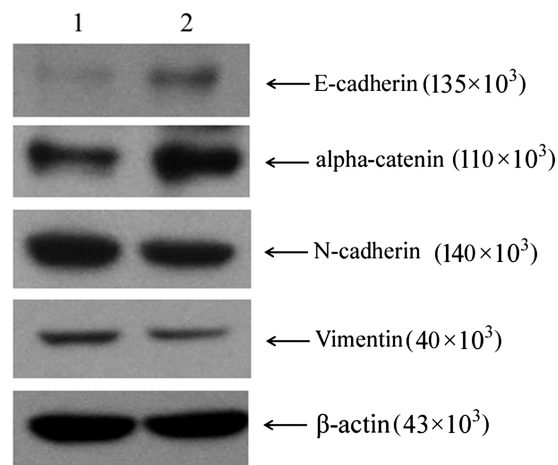


图3 细胞划痕实验检测*oct4*沉默对细胞迁移能力的影响

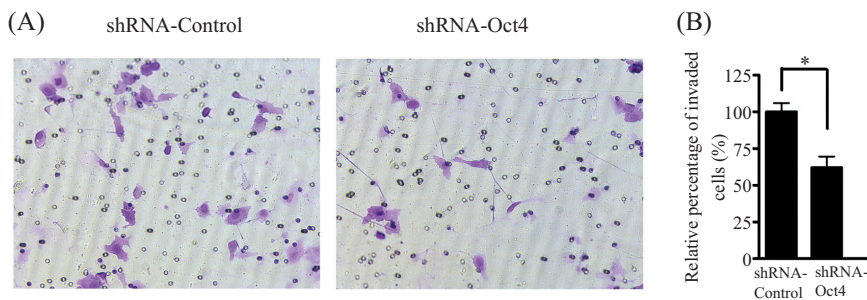
Fig.3 The effect of *oct4* knockdown on breast cancer cell motility was examined by wound-healing assay



1: shRNA-control; 2: shRNA-Oct4.

图5 Western blot分析*oct4*沉默对EMT标志物的影响

Fig.5 Western blot analysis of *oct4* silencing on expression of EMT markers



A: 穿过滤膜的细胞的显微镜图片; B: 穿过滤膜的细胞数的定量分析。* $P<0.05$, 与对照相比。

A: microscopy figure of cells invaded through matrigel; B: quantification of invaded cells. * $P<0.05$ vs shRNA-control.

图4 细胞侵袭实验检测*oct4*沉默对细胞侵袭能力的影响

Fig.4 The effect of *oct4* knockdown on breast cancer cell invasion was examined by cell invasion assay

步验证*oct4*在肿瘤侵袭中的作用, 我们采用了肿瘤细胞侵袭实验。结果显示, *oct4*基因沉默的肿瘤细胞穿过带Matrigel小室滤膜的细胞数显著低于对照组细胞 ($P<0.05$)(图4)。通过对穿过滤膜的细胞数进行定量分析, 我们发现*oct4*基因沉默的肿瘤细胞中穿过滤膜的细胞数降低近50%(图4)。

2.4 Oct4沉默对上皮-间质转化(EMT)的影响

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞受到细胞外因子刺激后向间质细胞转化的现象; 通过EMT, 上皮细胞失去了细胞极性, 失去与基底膜的连接等上皮表型, 获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。EMT是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。鉴于以上的发现, 我们进一步通过Western blot检测Oct4对多个

EMT标志物的影响。Western blot结果显示, *oct4*沉默后上皮细胞标志物E-cadherin、alpha-catenin明显上调; 而间质细胞标志物Vimentin、N-cadherin则明显下降(图5)。

3 讨论

Oct4是由*Pou5F1*基因编码产生的, 定位于人类染色体6p21.3, 其编码的蛋白Oct4(也叫Oct3)是一种POU转录因子, 属于V类POU蛋白。Oct4表达于卵母细胞、原始生殖细胞和胚胎干细胞、小鼠植入前胚胎、原肠胚的外胚层, 提示其与细胞的多能性分化密切相关^[6]。研究发现, Oct4仅在未分化的胚胎干细胞中表达, 当这些细胞向体细胞分化的过程中, Oct4的表达下降或缺如^[7]。因此, Oct4表达水平的高低直接影响着干细胞的分化方向^[8]。肿瘤细胞

生长、转移和复发的特点与干细胞的基本特性十分相似, 因此部分研究者提出了肿瘤干细胞理论。肿瘤干细胞是指肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞, 肿瘤的生长、转移、复发是靠少数的肿瘤干细胞不断自我更新以及繁衍来维持和促成的^[9]。因此, 检测调控干细胞自我更新的关键基因在肿瘤细胞中的表达具有非常重要的意义。本研究首先分析转录因子Oct4在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达水平。乳腺癌及其癌旁组织中均可检测Oct4蛋白的表达, 并且乳腺癌组织中Oct4蛋白的表达水平明显高于癌旁组织, 但Oct4蛋白的表达与乳腺癌干细胞的关系有待我们深入进一步研究。

上皮细胞-间质转化是指上皮细胞在正常生理和特定病理情况下向间质细胞转化的现象。乳腺恶性肿瘤细胞借助EMT方式增加癌细胞的迁移和运动能力, 从而促进乳腺癌细胞的侵袭及转移。EMT主要的特征有细胞黏附分子(如E-钙黏蛋白、 α -cadherin)表达的减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白(Vimentin)为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征等^[10]。近年研究发现, 肿瘤细胞发生、转移, 伴随着EMT发生的同时获得自我更新并形成新的肿瘤的能力^[11], 与肿瘤干细胞特点非常类似, 该研究证实EMT可以诱导上皮来源的肿瘤产生肿瘤干细胞。目前, 已有研究报道Oct4参与乳腺癌细胞的EMT过程。Hu等^[12]报道Mir145通过下调oct4基因的表达, 从而抑制了乳腺癌细胞的EMT过程。我们的研究证实Oct4参与了乳腺癌细胞的EMT过程, 但是Oct4在EMT中的具体作用尚存争议。本研究发现, oct4的基因沉默明显抑制了乳腺癌细胞的迁移及侵袭能力, 并进一步发现Oct4参与调控了多个与EMT过程密切相关的关键蛋白。这

一研究发现进一步为肿瘤发生的肿瘤干细胞学说提供新的证据, 并对于Oct4在乳腺癌组织中表达规律的研究及其是否参与乳腺癌的发生发展均有积极的指导作用。

参考文献 (References)

- 1 Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, *et al.* Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 2004; 279(17): 17063-9.
- 2 Deev IE, Polianovskii OL. oct-genes and oct-proteins. *Mol Biol (Mosk)* 2004; 38(1): 48-55.
- 3 de Jong J, Looijenga LH. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: History and future. *Crit Rev Oncog* 2006; 12(3/4): 171-203.
- 4 Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: Evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 495-502.
- 5 Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68(16): 6533-40.
- 6 Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; 12(5/6): 321-9.
- 7 Hansis C. Totipotency, cell differentiation and reprogramming in humans. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(4): 551-7.
- 8 Buitrago W, Roop DR. Oct-4: the almighty POUripotent regulator? *J Invest Dermatol* 2007; 127(2): 260-2.
- 9 Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23(43): 7274-82.
- 10 Tiwari N, Gheldof A, Tatari M. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(3): 194-207.
- 11 Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11254-62.
- 12 Hu J, Guo H, Li HY, Liu Y, Liu J, Chen L, *et al.* MiR-145 regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by targeting Oct4. *PLoS One* 2012; 7(9): e45965.