

乳腺癌细胞中MRJ稳定干扰导致MMP-9 表达增强和细胞骨架重排

彭娜娜¹ 庄红芹¹ 王 耀^{2*} 华子春^{1*}

(¹南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;

²新南威尔士大学圣乔治医学院, 悉尼, 新南威尔士州 2217, 澳大利亚)

摘要 应用构建稳定乳腺癌细胞系的方法研究MRJ干扰后上调乳腺癌细胞中基质金属蛋白酶MMP-9的表达, 并影响细胞骨架的重排。为了探讨MRJ(S)与MMP-9和细胞骨架的关系, 将MDA-MB-231细胞转染干扰质粒pRNAT-U6.1/neo-MRJsi, 用G418(Zeocin)(600 μg/mL)筛选得到MRJ(S)稳定干扰的细胞系, 命名为MDA-MB-231/MRJsi。利用Q-PCR和Western blot检测MDA-MB-231/MRJsi细胞和野生型细胞之间MRJ mRNA水平和蛋白水平的差异。利用鬼笔环肽染色和anti- α -tubulin的免疫荧光分析观察MDA-MB-231/MRJsi细胞系中微丝和微管的变化。同时, 利用明胶酶谱法检测MDA-MB-231和MDA-MB-231/MRJsi细胞系中基质金属蛋白酶MMP-9的酶活性变化并进一步利用Q-PCR检测MRJ干扰后细胞内MMP-9的mRNA水平差异。结果表明, 成功构建MRJ稳定干扰的MDA-MB-231/MRJsi稳定细胞系, 与野生型MDA-MB-231细胞比较, MDA-MB-231/MRJsi细胞系中MRJ mRNA水平下降了50%($P < 0.05$), MRJ(S)蛋白表达水平下调70%; 细胞骨架微丝和微管发生重排; MMP-9酶活性增强; MMP-9的mRNA水平显著上升($P < 0.01$), 与其酶活性水平变化一致。该文MDA-MB-231/MRJsi稳定细胞系提供了一个研究MRJ(S)与乳腺癌发生发展的细胞模型; MRJ(S)可以影响MDA-MB-231细胞中MMP-9的表达并引发细胞骨架重排。

关键词 乳腺癌; MRJ; 细胞骨架; 基质金属蛋白酶

siRNA-mediated Stably Knockdown of MRJ Up-regulates Expression of MMP-9 and Leads to Cytoskeleton Rearrangement in Breast Cancer

Peng Nana¹, Zhuang Hongqin¹, Wang Yao^{2*}, Hua Zichun^{1*}

(¹The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

²Division of Critical Care and Surgery, St. George Hospital, Univerdity of New South Wales, Sydney, NSW 2217, Australia)

Abstract MRJ knockdown stable cell line of breast cancer MDA-MB-231 cells were constructed and screened with plasmid of MRJ siRNA. The MRJ knockdown stable cell line was used to investigate the effects of MRJ on cytoskeleton rearrangement and the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). We transfected the MDA-MB-231 cells with the plasmid of MRJ siRNA (pRNAT-U6.1/neo-MRJsi) and used 600 μg/mL G418 to screen the stable knockdown cell line. The selected cell line was then subjected to Real-time PCR and Western

收稿日期: 2013-04-29 接受日期: 2013-06-28

科技部(批准号: 2012CB967004、2012AA020304、2008BAI51B01)和江苏省科技厅(批准号: BK2011228、BZ2011048)资助的课题

*通讯作者。Tel: +61-2-95293680, E-mail: yao_wang_au@yahoo.com; Tel: 025-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

Received: April 29, 2013 Accepted: June 28, 2013

This work was supported by Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2012CB967004, 2012AA020304, 2008BAI51B01) and the Department of Science and Technology of Jiangsu Province (Grant No.BK2011228, BZ2011048)

*Corresponding authors. Tel: +61-2-95293680, E-mail: yao_wang_au@yahoo.com; Tel: +86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn.

网络出版时间: 2013-08-29 14:43 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130829.1443.005.html>

blot assay to quantitate the mRNA level and protein level. Then immunofluorescence was used to investigate the distribution of microtubules and microfilaments using anti- α -tubulin antibody and phalloidin dyes, respectively. Moreover, the enzyme activity of MMP-9 was measured using gelatin zymography and its mRNA level was detected using quantitative Real-time PCR. The results showed that we successfully established MDA-MB-231/MRJsi stable cell line that knockdowned MRJ expression and named it MDA-MB-231/MRJsi cell line. The gene expression of *MRJ* in MDA-MB-231/MRJsi cells reduced 50% compared to the wild type MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$) and the protein level reduced 70%. Moreover, the cytoskeleton proteins in MDA-MB-231/MRJsi cells were redistributed when compared to wild type MDA-MB-231 cells. Furthermore, the enzyme activity of MMP-9 was enhanced after MRJ suppression. In addition, the mRNA level of *MMP-9* was increased significantly ($P < 0.01$) which was consistent with its enzyme activity. In conclusion, the establishment of stable MDA-MB-231/MRJsi cell line is a fundamental cell model for further research of MRJ function in oncogenesis and development of breast cancer.

Key words breast cancer; MRJ; cytoskeleton; MMP-9

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升的趋势。深入研究乳腺癌发生、发展的分子机制对于乳腺癌的预防、治疗和预后具有重要意义。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)在很多肿瘤组织和细胞中呈高水平表达,并且与肿瘤的发生发展和不良预后相关^[1-3]。HSPs作为分子伴侣通过自身基因的异常表达,调控着肿瘤细胞中众多关键蛋白性质及功能的改变。HSP27、HSP70、HSP90在乳腺癌中均有过表达^[4-7]。在乳腺癌病人进行联合化疗、放疗、热疗过程中,HSP70水平的升高与无病生存期短、肿瘤转移和不良预后相关^[8]。HSP40是热休克蛋白家族中的重要成员之一,其家族成员HLJ1被报道是一种新的肿瘤抑制基因^[9]。MRJ(mammalian relative of DNA J)也称为DNAJB6,是HSP40家族的一个新成员,是DNA J在哺乳动物中的同源类似物。DNA J蛋白家族作为重要的共分子伴侣通常协助DNA K/HSP70进行一系列的蛋白折叠活动^[10]。MRJ有两个剪接变体:变体L(2.5 Kb)和变体S(1.6 Kb)。与MRJ(S)相比,MRJ(L)具有一个细胞核定位序列,MRJ(L)主要分布在细胞核中,而MRJ(S)多分布在细胞质中。MRJ参与很多生理功能。在亨廷顿疾病(Huntington's disease)体外细胞模型中,MRJ(S)过表达可以有效抑制蛋白聚集、caspase活性和细胞毒性^[11]。MRJ(S)可以和角蛋白(keratin)中间丝相互作用^[12]。MRJ(L)可以降低乳腺癌细胞的恶性度^[13]。我们之前的研究表明,在乳腺癌细胞中,免疫共沉淀实验发现,MRJ(S)和uPAR存在相互作用。为了探讨MRJ(S)在乳腺癌发生发展中的生物学

功能,本研究采用RNA干扰和建立稳定细胞系的方法,检测MRJ(S)基因表达的降低对乳腺癌细胞中基质金属蛋白酶的影响和对细胞骨架的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞培养基DMEM为美国GIBCO产品,使用时添加FBS(fetal bovine serum, GIBCO)和抗生素(100 U/mL青霉素, 100 μ g/mL链霉素); G418和用于转染的Lipofectamine[®] 2000购自Introvigen公司。Trizol试剂购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒购自TOYOBO公司, Q-PCR试剂SYBR Green mix购自Bio-Rad公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、Triton X-100购自上海生工生物工程股份有限公司; 明胶、多聚甲醛购自Sigma公司; anti- α -tubulin购自美国Santa Cruz公司, 鬼笔环肽购自Invitrogen公司; 单克隆抗体anti-MRJ购自台湾Abnova公司; anti-GAPDH购自美国Santa Cruz公司。pRNAT-U6.1/neo载体购自美国Genescript公司; 质粒pRNAT-U6.1/neo-MRJsi由本实验室提供。MDA-MB-231(人乳腺癌细胞系)细胞购自American Type Culture Collection (ATCC, Philadelphia, PA, USA)。6孔培养板和60 mm细胞培养皿购自美国Costar公司; CO₂细胞培养箱购自Thermo Scientific公司; 倒置荧光显微镜(ZEISS); 共聚焦显微镜(Olympus公司)。

1.2 细胞培养和转染

MDA-MB-231细胞在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱中培养, 培养液为含10% FBS和双抗(青霉素和链

霉素)的DMEM培养液。待细胞密度达到50%~60%,在脂质体Lipofectamine® 2000的介导下进行细胞转染,方法参照说明书。已构建成功的MDA-MB-231/MRJs多克隆稳定细胞系添加600 µg/mL G418(Geneticin)来保持选择性。

1.3 MDA-MB-231/MRJs多克隆稳定细胞系的构建

G418应用浓度的确定:取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于6孔培养板,待细胞完全贴壁后,根据文献报道加不同浓度的G418:200,400,500,600,800,1 000 µg/mL。选择可以使细胞在10~14天内死亡的最低浓度为应用浓度。MDA-MB-231细胞的瞬时转染:取对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于直径为60 mm的中型培养皿中,待细胞汇合度达到50%时,转染6 µg pRNAT-U6.1/neo-MRJs质粒。G418筛选:48 h后加入G418终浓度为600 µg/mL的DMEM培养液进行压力筛选,3天换一次液,筛选9天后换成G418终浓度为400 µg/mL的DMEM培养液继续筛选,直至dish中剩余的几个细胞开始重新增殖时重新换成G418终浓度为600 µg/mL的DMEM培养液,此细胞即为筛选出的阳性多克隆,命名为MDA-MB-231/MRJs。继续培养,让筛选出的阳性克隆进行传代,冻存一部分细胞。

1.4 实时定量PCR(Real-time quantitative PCR或Q-PCR)分析

引物设计:MMP-9引物设计参照文献[14],其他引物由本实验室设计(表1),定量PCR中对引物进行溶解曲线检验。细胞mRNA提取:取对数生长期的MDA-MB-231细胞和MDA-MB-231/MRJs细胞接种于6孔培养板中,24 h后将培养板从培养箱中取出,用RNase free的枪头吸净培养液,每孔加1 mL Trizol,用枪吹打后移入RNase free的EP管中。Trizol法提取细胞内总RNA的步骤参照说明书进行。逆转录:采用20 µL逆转录体系,将提取的模板RNA按照每个样品2 µg计算其体积,按照TOYOBO逆转录试剂盒说明书的操作步骤进行。加样完成后,37 °C水浴30 min,85 °C水浴2 min终止反应。剩余的RNA置于-80 °C保存,将逆转录的cDNA自然冷却后待用。Q-PCR检测:将上述获得的cDNA稀释100倍用做模板,Q-PCR反应体系(20 µL):cDNA:8 µL;Sense primer:1.0 µL;Antisense primer:1.0 µL;2×SYBR Green:10 µL。Q-PCR程序设定:95 °C,10 min;40个循环(95 °C,15 s;60 °C,1 min);

95 °C,15 s。结果分析方法采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.5 Western blot检测

用细胞刮分别收取对数生长期的MDA-MB-231细胞和MDA-MB-231/MRJs细胞,加入细胞裂解液[50 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)、250 mmol/L NaCl、0.5% Triton-X 100、50 mmol/L NaF、2 mmol/L EDTA、1 mmol/L Na_3VO_4 和protein inhibitor cocktail]吹打混匀,冰上放置45 min,离心(4 °C,12 000 r/min,15 min)后取上清用Bradford比色法测定蛋白浓度进行定量,加入5×loading buffer沸水浴10 min,冷却后置于-20 °C贮存。配制13% SDS-PAGE胶,取质量相同(80~100 µg)的样品上样,预留1到2个孔加3 µL预染Marker(Bio-rad)以指示不同分子量蛋白在胶上的位置。上层胶用80 V恒压浓缩,在溴酚蓝进入下层胶时改用120 V恒压分离,然后用半干法将PAGE胶中的蛋白转移至PVDF膜上(恒压9 V,2 h)。转印好的PVDF膜放入5%脱脂牛奶(PBST配置)中封闭1 h,根据抗体说明书用PBST将一抗稀释至最佳工作浓度并一起封入塑料袋中包被,室温置摇床上1 h或4 °C过夜。PBST洗涤(5 min,3次)后,包被按适当比例稀释好的用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温摇床45 min~1 h。PBST洗涤后配置发光底物溶液滴加到PVDF膜上2 min,然后吸干多余发光液拍照,根据条带的强弱判断蛋白的表达情况。GAPDH用来进行蛋白量的归一化。

1.6 免疫荧光(immunofluorescence microscopy)分析

利用砂轮将玻片切成合适大小的方块,灭菌后置于干净的12孔板中。取对数生长期的MDA-MB-231细胞和MDA-MB-231/MRJs细胞,用胰酶消化成单细胞悬液,滴到玻片上于细胞培养箱中培养。待细胞贴壁后(约24 h)取出爬片,用PBS洗2次,于4%多聚甲醛中固定1 h。用PBS洗掉爬片上的多聚甲醛,置于0.5% Triton X-100中穿孔1 h后置于3% BSA中封闭非特异性蛋白。加入3% BSA稀释的一抗(鬼笔环肽或tublin)室温孵育1 h或4 °C过夜,PBS漂洗(5 min,3次),加入3% BSA稀释的二抗避光孵育45 min,PBS避光漂洗(5 min,3次),加入细胞核染液DAPI染色2 min并用抗猝灭封片剂封片,于暗室中荧光显微镜下拍照。

1.7 明胶酶谱法

样品制备:取对数生长期的MDA-MB-231细胞

表1 实时定量PCR引物

目标基因 Target gene	引物序列 Primer sequences
<i>MMP-9</i>	F: 5'-GGA CGA TGC CTG CAA GT-3' R: 5'-ACA AAT ACA GCT GGT TCC CAA TC-3'
<i>MRJ</i>	F: 5'-AAG TGC TGT CGG ATG CTA AG-3' R: 5'-CCT GAA GAC ATC ATC TGG GT-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AAC GAC CCC TTC ATT GAC-3' R: 5'-TCC ACG ACA TAC TCA GCA C-3'

和MDA-MB-231/MRJs细胞, 消化计数, 以相同的细胞量接种于6孔培养板中, 待细胞完全贴壁后, 吸掉培养液, 用PBS洗净残余的培养液, 每个孔中加入1 mL无血清的DMEM培养液, 于37 °C, 5% CO₂条件下培养。48 h后, 在冰上收集上清液, 用EP管分装好后并置于-80 °C冰箱保存。酶谱胶配制: 遵照分子克隆书上的10% SDS-PAGE胶的制备方法, 其中下层分离胶添加终浓度为1 mg/mL的明胶。将含MMPs的细胞上清溶液24 μL与6 μL的5×上样缓冲液混合后在37 °C保温30 min, 然后上样进行电泳, 电泳在4 °C条件下进行。电泳结束后, 将电泳胶依次用洗胶缓冲液1-4(buffer 1: 2.5% Triton X-100, 3 mmol/L NaN₃; buffer 2: 2.5% TritonX-100, 50 mmol/L Tris, 3 mmol/L NaN₃; buffer 3: 2.5% TritonX-100, 50 mmol/L Tris, 3 mmol/L NaN₃, 5 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 1 μmol/L ZnCl₂; buffer 4: 50 mmol/L Tris, 3 mmol/L NaN₃, 5 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 1 μmol/L ZnCl₂)洗30 min, 之后, 将胶放入洗胶缓冲液4中, 放在37 °C振荡保温16 h, 用考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色直至出现透明条带为止。

1.8 统计学分析

应用SPSS 18.0统计学软件进行统计分析, 实验数据均以平均数±S.E.M表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 MDA-MB-231/MRJs细胞系的构建

用G418(Zeocin)筛选转入pRNAT-U6.1/neo-MRJs质粒的MDA-MB-231细胞, 加压选择后获得能在600 μg/mL的G418中稳定传代的细胞系。Q-PCR检测MDA-MB-231/MRJs细胞中的*MRJ*表达水平与Wild type细胞相比有50%下降(图1A), 差异有显著性

意义($P < 0.05$)。溶解曲线显示: 以合成的cDNA为模板, MRJ引物的Q-PCR扩增产物在熔点曲线分析过程中均出现一个峰, 表明不存在明显的引物二聚体或非特异产物(图1B)。由于含MRJ siRNA的质粒载体为pRNAT-U6.1/neo, 载体中自带GFP的表达质粒, 所以筛选的稳定干扰细胞系在显微镜下观察带有绿色荧光, 这是稳定干扰细胞株成功构建的一个直观的实验验证(图1C)。另外, Western blot结果表明, MRJ稳定干扰的细胞系中MRJ(S)的蛋白水平下调约70%(图1D)。这些结果说明, MDA-MB-231/MRJs细胞产生了稳定的干扰效果。MRJs稳定干扰乳腺癌细胞系可以避免常规的RNAi瞬时转染实验存在的由于转染效率导致的实验误差甚至误判, 为进一步的深入研究奠定了基础。

2.2 MRJ下调对细胞骨架蛋白微丝的影响

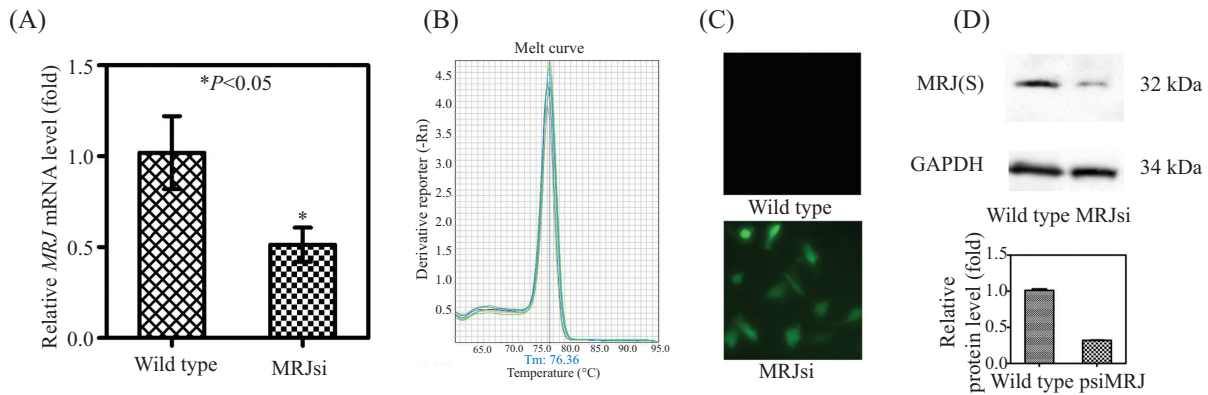
微丝(F-actin)是由肌动蛋白分子螺旋状聚合而成的纤丝, 在交联蛋白的绑定下形成束状网络结构和树突状网络结构, 并对细胞的丝状伪足起支持作用, 从而促进细胞的形态变化、趋化和通讯。用鬼笔环肽染色细胞的F-actin, 从图2可以看出, MDA-MB-231/MRJs微丝排布分散, 在细胞内排布交错无规则, 有较多的应力纤维和丝状伪足。而MDA-MB-231细胞中微丝分布呈束状结构, 大部分朝一个方向分布, 与MDA-MB-231/MRJs紊乱有明显差异。

2.3 MRJ下调对细胞骨架蛋白微管的影响

微管(α -tubulin)是由微管蛋白原丝组成的、不分枝的中空管状结构, 与细胞支持和运动有关。图3显示, MDA-MB-231/MRJs阳性细胞(表达绿色荧光蛋白的细胞)中微管蛋白两端末梢处逐渐聚集成束向两端延伸, 具有较强的极性, 可能参与物质运输。MDA-MB-231细胞微管蛋白主要呈辐射状分布在细胞核周围。

2.4 干扰MRJ对MMP-2和MMP-9酶活性的影响

已有文献报道, 在星形胶质细胞(astrocytes)中, MMP-9可以调控细胞骨架actin的组装和分布^[15]; 在乳腺癌细胞中, 免疫荧光分析发现活化的MMP-9分布于细胞的树突状伪足中^[16]; Akt信号可以通过诱导MMP-2的活化来调控微丝的排布^[17]。文献中鲜有关于MRJ与细胞微丝和微管蛋白的报道。基于上述证据, 我们假设MRJ下调引起细胞骨架重排是由MMP-2或MMP-9引起的, 于是应用明胶酶谱法进



A: Q-PCR分析MDA-MB-231/MRJs细胞系中MRJ表达水平; B: MRJ引物的溶解曲线; C: GFP的表达; D: Western blot检测MRJ蛋白水平。

A: Q-PCR analysing the gene expression of *MRJ*; B: primer specificity analyzed by the melting curve; C: the GFP expression; D: MRJ protein level analyzed by Western blot assay.

图1 MRJ稳定干扰细胞系的验证

Fig.1 The demonstration of the MRJ knockdown stable cell line

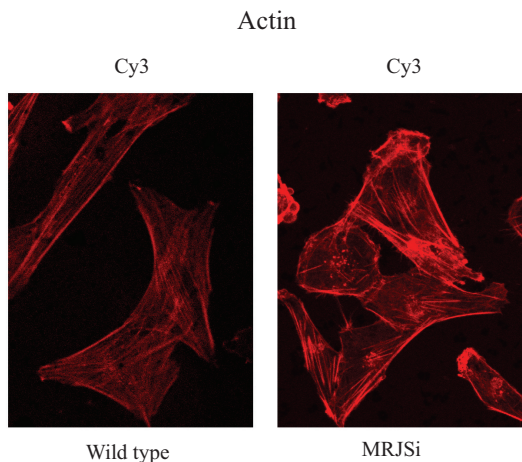


图2 干扰MRJ后引起细胞微丝重排

Fig.2 Suppression of MRJ led to microfilament rearrangement

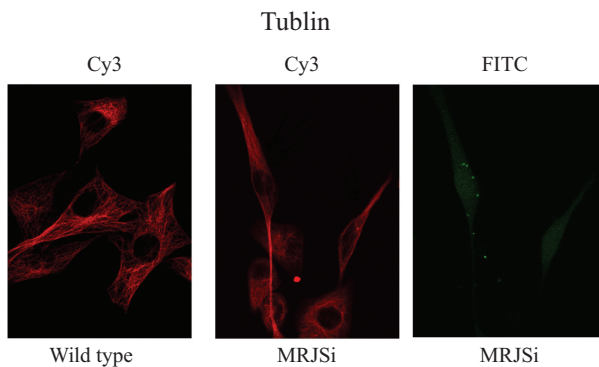


图3 干扰MRJ后引起细胞微管重排

Fig.3 Suppression of MRJ led to microtubule redistribution

行验证。明胶酶谱法的实验的原理是将MMP-2和MMP-9的特异性底物明胶混于SDS-PAGE胶中, 通过负染法分析条带的明暗大小来分析酶的活性。本

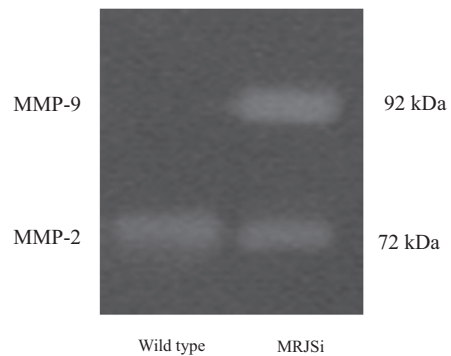


图4 明胶酶谱法检测MMP-2和MMP-9酶活性

Fig.4 Gelatin zymography analysis of the activities of MMP-2 and MMP-9

文将细胞培养48 h后, 用明胶酶谱分析显示MDA-MB-231细胞和MDA-MB-231/MRJs细胞中MMP-2和MMP-9的酶活性。与对照组MDA-MB-231细胞相比, MDA-MB-231/MRJs细胞中MMP-9活性显著上升, 与Q-PCR结果趋势一致。结果显示, MRJ下调可以促进MMP-9的酶活性, 而MMP-2酶活性没有明显变化, 揭示了MRJ干扰可以特异地影响MMP-9的酶活性。

2.5 干扰MRJ对MMP-9 mRNA的影响

为了进一步验证MMP-9酶活性的增加是否由其转录水平引起的, 我们又进行了实时定量PCR实验。结果如图5所示, 溶解曲线显示: 以合成的cDNA为模板, MMP-9引物的Q-PCR扩增产物在熔点曲线分析过程中均出现一个峰, 表明不存在明显的引物二聚体或非特异产物。Q-PCR检测基因表达结果

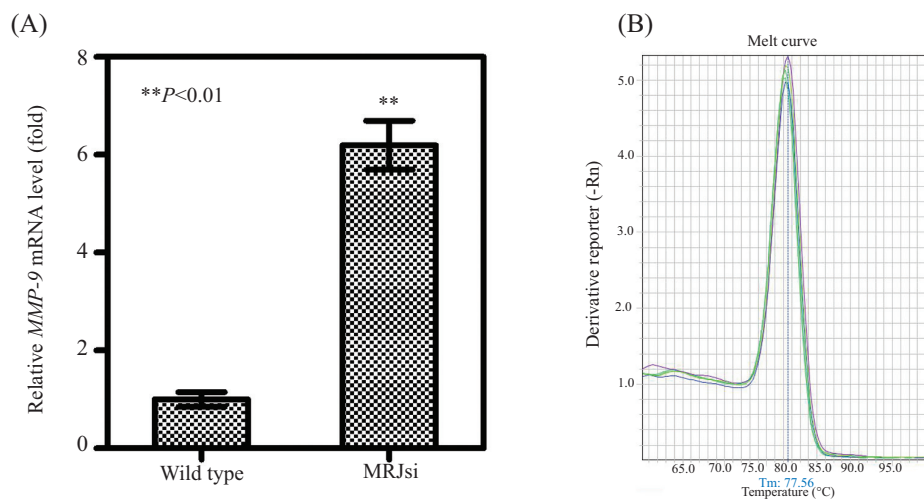


图5 Q-PCR分析MMP-9 mRNA水平(A)及引物的溶解曲线(B)分析

Fig.5 Q-PCR analyzing the gene expression of *MMP-9* (A) and primer specificity analysed by the melting curve (B)

显示: 与野生型MDA-MB-231细胞相比, MDA-MB-231/MRJsi细胞中的MMP-9基因表达上升了约5倍, 存在显著的差异($P<0.01$)。此结果表明: MRJ很有可能通过增加MMP-9的转录水平来提高MMP-9的酶活性。

3 讨论

全世界每年约有120万妇女发生乳腺癌, 有50万妇女死于乳腺癌。京沪津等大城市的统计数据表明, 乳腺癌也是我国女性最常见的恶性肿瘤。研究证实, HSP40与乳腺肿瘤的发展密切相关^[18]。有文献报道在女性泌尿生殖道和乳腺肿瘤中检测到HSP70和Hdj(HSP40), ELISA检测发现恶性肿瘤中HSP70和Hdj的表达水平高于良性细胞^[19]。DNAJB6介导DKK1(dickkopf 1 homologue)转录水平的上调来抑制Wnt/catenin信号途径从而抑制肿瘤的迁移并影响EMT途径^[20], Micro-RNA632下调DNAJB6的表达从而促进乳腺癌细胞的迁移^[21]。因此, 研究MRJ对乳腺癌细胞的生物学行为具有重要意义, 可以为乳腺癌的治疗和预后提供相关参考。

在本研究中, 我们将MRJ(S)的干扰质粒pRNAT-U6.1/neo-MRJsi转染到乳腺癌细胞MDA-MB-231中, 用G418筛选得到稳定表达MRJ干扰质粒的细胞株。Q-PCR分析表明, 稳定细胞株中MRJ的mRNA表达下调50%, 稳定表达干扰质粒上自带GFP荧光蛋白得到表达, 并且MRJ的蛋白水平下调约70%。本细胞系的构建为相关研究提供了一个较为理想的细胞模型。

细胞骨架是由细胞内丝状聚合物和骨架调控蛋白构成的内在网络。微管和微丝是细胞骨架中具有极性的两个骨架蛋白, 可以支撑细胞的定向运动。微管蛋白刚性最强, 运动形式多为聚合和解聚作用, 在细胞分裂中担任重要角色。微丝蛋白的运动主要是由细胞外的信号引起的, 通过四种典型力: 分支肌动蛋白丝网络形成突起、束状纤维形成丝状伪足、皮质层网络和束状纤维形成应力纤维, 使骨架延伸获得合适的力量使细胞迁移^[22]。细胞骨架保证有序的细胞结构维持细胞形态, 热休克蛋白保证正确的蛋白结构维持细胞稳态。细胞骨架极性的形成依赖于微丝引起细胞原有的均衡性的打破和微管对极性的维持。本实验中, MDA-MB-231/MRJsi细胞打破野生型细胞中微丝的规则束状纤维结构, 呈无规则分散排布, 有较多的丝状伪足和应力纤维; 而MRJ干扰后微管蛋白聚集成束向两端延伸, 细胞极性增强。这种极性可以使来源于生物合成或内吞途径的细胞膜分子转移到细胞前端(leading edge)^[23], 如MMP-9, 进一步通过信号或细胞微环境来调控细胞骨架蛋白的分布, 从而使细胞与基质之间的降解和黏附有序定向进行。

相关文献报道, MMP-9可以调控细胞骨架蛋白的排布。在星形胶质细胞(astrocytes)中, MMP-9可以调控细胞骨架蛋白actin的组装和分布, 促进细胞膜突起的形成^[15]。在乳腺癌细胞中, 免疫荧光分析发现活化的MMP-9分布于细胞的树突状伪足中^[16], 并且MMP-9的高表达是和Integrin的信号通路相关的^[24], 而integrin通过下游信号通路可以和细

胞骨架进行对话(crosstalk)从而进行调控^[25-26]。更有趣的是, MMPs和HSPs关系密切。在乳腺癌中, HSP90和HSP70可以激活MMP-2的酶活性^[27]。在非小细胞肺癌中, HLJ1(HSP40家族的一个成员)可以和NPM1(nuclear protein nucleophosmin)相互作用, HLJ1沉默加速NPM1的寡聚化, 抑制AP-2 α 的转录, 从而使MMP-2活性增加^[28]。另外, 关于热休克蛋白与细胞骨架关系的报道也有很多: HSP90可以和微管结合^[29]; HSP70在确定为分子伴侣前曾被认为是微管相关蛋白, HSP70可以通过tau(一种微管相关蛋白)调控tubulin^[30], 也可以和TCP-1相互作用间接影响actin; 一些小的热休克分子也可以和细胞骨架相互作用, 通过磷酸化依赖的方式影响骨架的聚合性^[31], 但是对于MRJ影响细胞骨架的机理很少有相关报道。基于以上三点原因, 我们大胆推测MRJ可能是通过MMP-9来影响细胞骨架的。本文运用明胶酶谱法分析发现MDA-MB-231/MRJs细胞中MMP-9的酶活性显著上升。我们同时检测了MMP-2的活性, 结果显示MMP-2的活性并未发生显著改变, 从而表明MRJ对于MMP9的调控具有MMP9蛋白特异性。我们进一步利用Q-PCR技术对MDA-MB-231/MRJs中MMP-9的mRNA表达进行检测, 发现MMP-9 mRNA水平增加5倍。此结果揭示了MRJ的表达下调使MMP-9基因转录增强, 这可能是因为类似于HLJ1的机制的作用, 即MRJ干扰后抑制了转录辅阻遏物的表达, 从而使MMP基因表达增加。基于本实验中MRJ干扰显著上调MMP-9的表达, 已有文献报道MRJ和MMPs的紧密关联性, 以及报道MMP-9与细胞骨架的相关性, 本文推测MRJ通过MMP-9的作用影响细胞骨架的重排, 可能是MRJ下调后增强了MMP-9转录水平, 从而引起细胞骨架蛋白微管和微丝的重排。

综上所述, MRJ蛋白的异常表达可能在人乳腺癌的发生、发展中起重要的作用。本文中MRJ的干扰可以显著上调乳腺癌中的MMP-9的活性, 可能进一步对细胞骨架蛋白的分布产生影响, 应答细胞对外界环境和内部信号的刺激, 这些结果从一个侧面验证了MRJ与乳腺癌细胞的密切关系。目前, 以细胞骨架为靶向的一些药物已经相继进入二到三期临床试验, 有的甚至被作为某些肿瘤的二三线临床用药^[32]。这为MRJ的在乳腺癌细胞骨架中的功能研究提供了新的思路。不管通过靶向MMPs途径来靶向

细胞骨架途径、还是直接靶向细胞骨架途径, MRJ均有可能为乳腺癌分子治疗提供新方向。

参考文献 (References)

- 1 Ashok BT, Kim E, Mittelman A, Tiwari RK. Proteasome inhibitors differentially affect heat shock protein response in cancer cells. *Int J Mol Med* 2001; 8(4): 385-90.
- 2 徐敏, 王树滨, 刘雅洁, 陈亦欣, 孙宇萍, 陈伟. 热休克蛋白70在乳腺癌中的表达及其与预后的关系. *实用肿瘤杂志*(Xu Min, Wang Shubin, Liu Yajie, Chen Yixin, Sun Yuping, Chen Wei. Expression of heat shock protein 70 and its relation with prognosis of patients with breast cancer. *Journal of Practical Oncology*) 2004; 19(2): 110-4.
- 3 苏荣建, 李宏丹, 宋慧娟, 魏嘉. 葡萄糖调节蛋白78反义核酸对HEK293细胞粘附和迁移的影响. *细胞生物学杂志*(Su Rongjian, Li Hongdan, Song Huijuan, Wei Jia. The effects of Grp 78 AS-ODN on the adhesion and migration of HEK 293 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2009; 31(3): 389-94.
- 4 Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence JA, Steeg PS, Hilsenbeck SG, Harvey JM, *et al.* The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis* 1997; 17(3): 113-23.
- 5 Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(7): 570-4.
- 6 Yano M, Naito Z, Yokoyama M, Shiraki Y, Ishiwata T, Inokuchi M, *et al.* Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett* 1999; 137(1): 45-51.
- 7 Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, *et al.* High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67(7): 2932-7.
- 8 Liu FF, Hill RP. Potential role of HSP70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *Int J Hyperthermia* 1996; 12(2): 301-2.
- 9 Chen HW, Lee JY, Huang JY, Wang CC, Chen WJ, Su SF, *et al.* Curcumin inhibits lung cancer cell invasion and metastasis through the tumor suppressor HLJ1. *Cancer Res* 2008; 68(18): 7428-38.
- 10 李国良, 李冰, 周鑫, 周人纲. J蛋白研究进展. *细胞生物学杂志*(Li Guoliang, Li Bing, Zhou Xin, Zhou Rengang. Progress in J-domain protein. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2005; 27(10): 514-8.
- 11 Chuang JZ, Zhou H, Zhu M, Li SH, Li XJ, Sung CH. Characterization of a brain-enriched chaperone, MRJ, that inhibits Huntingtin aggregation and toxicity independently. *J Biol Chem* 2002; 277(22): 19831-8.
- 12 Izawa I, Nishizawa M, Ohtakara K, Ohtsuka K, Inada H, Inagaki M. Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J Biol Chem* 2000; 275(44): 34521-7.
- 13 Mitra A, Fillmore RA, Metge BJ, Rajesh M, Xi Y, King J, *et al.* Large isoform of MRJ (DNAJB6) reduces malignant activity of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10(2): R22.
- 14 Liang X, Yang X, Tang Y, Zhou H, Liu X, Xiao L, *et al.* RNAi-

- mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor inhibits proliferation, adhesion, migration and invasion in oral cancer cells. *Oral Oncol* 2008; 44(12): 1172-80.
- 15 Hsu JY, Bourguignon LY, Adams CM, Peyrollier K, Zhang H, Fandel T, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *J Neurosci* 2008; 28(50): 13467-77.
- 16 Lilly YW, Bourguignon ZG, Naokoi DA. CD44v3,8-10 is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 176(1): 206-15.
- 17 Jin EJ, Park KS, Bang OS, Kang SS. Akt signaling regulates actin organization via modulation of MMP-2 activity during chondrogenesis of chick wing limb bud mesenchymal cells. *J Cell Biochem* 2007; 102(1): 252-61.
- 18 陈勇武, 王川, 傅芳萌, 许国玺, 杨发端, 康德勇. DNAJB6蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义. *国际病理科学与临床杂志*(Chen Yongwu, Wang Chuan, Fu Fangmeng, Xu Guoxi, Yang Farui, Kang Deyong. Protein expression of DNAJB6 and its clinical significance in breast cancer. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*) 2010; 30(1): 39-42.
- 19 Novoselov SS, Verbova MV, Vasil'eva EV, Vorob'eva NK, Margulis BA, Guzhova IV. Expression of Hsp70 and Hdj1 chaperone proteins in human tumor cells. *Vopr Onkol* 2004; 50(2): 174-8.
- 20 Menezes ME, Mitra A, Shevde LA, Samant RS. DNAJB6 governs a novel regulatory loop determining Wnt/beta-catenin signalling activity. *Biochem J* 2012; 444(3): 573-80.
- 21 Mitra A, Rostas JW, Dyess DL, Shevde LA, Samant RS. MicroRNA-632 downregulates DNAJB6 in breast cancer. *Lab Invest* 2012; 92(9): 1310-7.
- 22 Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010; 463(7280): 485-92.
- 23 Li R, Gundersen GG. Beyond polymer polarity: How the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(11): 860-73.
- 24 Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, *et al.* The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 2000; 87(3): 336-42.
- 25 DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(5): 572-82.
- 26 Cho BA, Cho NH, Seong SY, Choi MS, Kim IS. Intracellular invasion by *Orientia tsutsugamushi* is mediated by integrin signaling and actin cytoskeleton rearrangements. *Infect Immun* 2010; 78(5): 1915-23.
- 27 Sims JD, McCreedy J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 2011; 6(4): e18848.
- 28 Chang TP, Yu SL, Lin SY, Hsiao YJ, Chang GC, Yang PC, *et al.* Tumor suppressor HLJ1 binds and functionally alters nucleophosmin via activating enhancer binding protein 2alpha complex formation. *Cancer Res* 2010; 70(4): 1656-67.
- 29 Redmond T, Sanchez ER, Bresnick EH, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB, *et al.* Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 1989; 50(1): 66-75.
- 30 Kirby BA, Merrill CR, Ghanbari H, Wallace WC. Heat shock proteins protect against stress-related phosphorylation of tau in neuronal PC12 cells that have acquired thermotolerance. *J Neurosci* 1994; 14(9): 5687-93.
- 31 Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt 13): 1431-40.
- 32 Cormier A, Marchand M, Ravelli RB, Knossow M, Gigant B. Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. *EMBO Rep* 2008; 9(11): 1101-6.