

## 干扰人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 EPCR 表达对内皮细胞增殖、迁移及脉管形成的影响

刘冬梅<sup>1,2</sup>, 王庆苓<sup>1</sup>, 吴永平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>徐州医学院病理教研室, 江苏 徐州 221000; <sup>2</sup>扬州市东方医院耳鼻喉科, 江苏 扬州 225000)

**[摘要]** 目的:通过观察干扰乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内皮蛋白 C 受体(endothelial protein C receptor, EPCR)表达对内皮细胞的增殖、迁移、脉管形成能力的变化,分析 EPCR 在肿瘤血管形成中的作用。方法:采用 siRNA 方法降低人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 EPCR 的表达,通过 RT-PCR 及 Western blot 技术检测 EPCR 干扰效果,实验分为 EPCR 干扰组、无关序列组及未处理组。制备肿瘤条件培养基模拟肿瘤微环境培养 HUVECs 细胞,通过 CCK-8 法检测各组内皮细胞增殖能力,Transwell 小室检测内皮细胞迁移能力,Matrigel 检测内皮细胞脉管形成能力。结果:与未处理组及无关列序组相比,EPCR 干扰组细胞的增殖、迁移及脉管形成能力均明显降低( $P < 0.05$ )。结论:干扰乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 EPCR 的表达能够抑制内皮细胞增殖、迁移及脉管形成能力,提示 EPCR 可能在肿瘤血管形成中起重要作用。

**[关键词]** EPCR; 乳腺癌细胞; 人脐静脉内皮细胞; 增殖; 迁移; 脉管形成

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-315-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150304

## Effects of low-expressed EPCR on proliferation, migration and angiogenesis of HUVECs in human breast cancer cell line MDA-MB-231

Liu Dongmei<sup>1,2</sup>, Wang Qingling<sup>1</sup>, Wu Yongping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000; <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Yangzhou East Hospital, Yangzhou 225000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of endothelial protein C receptor(EPCR) on proliferation, migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial HUVECs cells, and to explore the role of EPCR in tumor angiogenesis. **Methods:** siRNA was performed to silence the expression of EPCR in human breast cancer cell line MDA-MB-231. The expression of EPCR in siRNA transfection was identified by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western Blot. The experiment included three groups: the EPCR siRNA group, the irrelevant sequence group and the control group. HUVEC cells were cultured under tumor microenvironment, which was simulated by tumor conditioned medium. CCK-8 kit was performed to detect the endothelial cells proliferation, the transwell method was for detection of endothelial cell migration numbers, and matrigel *in vitro* small tube formation assay was performed to survey the state of tube formation. **Results:** The EPCR siRNA group showed lower cell proliferation activity, less number of cell migrats and tube formation than the other two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Low-expressed EPCR in human breast cancer cell line MDA-MB-231 can inhibit the proliferation, migration and angiogenesis of endothelial cells, which shows that EPCR may play an important role in tumor angiogenesis.

**[Key words]** EPCR; breast cancer cell; HUVECs; proliferation; migration; angiogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 315-319]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81101493); 江苏省普通高校研究生科研创新课题(CXZZ13\_0985)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yongpingwu1957@gmail.com

内皮细胞蛋白 C 受体(endothelial protein C receptor, EPCR)是蛋白 C(protein C, PC)的特异性受体,能与 PC 结合增强细胞表面蛋白 PC 的活化,成为活化的蛋白 C(active protein C, APC),发挥抗凝、抗炎和抗凋亡等作用<sup>[1]</sup>。新近研究表明 EPCR 不仅

表达于血管内皮细胞,能够诱导血管内皮细胞增殖和血管形成,而且在多种肿瘤细胞中亦可表达,并且在某些肿瘤的转移、侵袭中起作用<sup>[2-15]</sup>,并有可能与肿瘤血管形成相关。本研究用 siRNA 方法降低人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 EPCR 的表达,然后收集肿瘤培养上清,制备成肿瘤条件培养基,作用于人脐静脉内皮细胞 HUVECs,检测内皮细胞的增殖、迁移、脉管形成能力,为进一步探讨 EPCR 在乳腺癌血管形成中的作用提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞及分组

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和人脐静脉内皮细胞 HUVECs,购自中国科学院细胞所。实验分成 EPCR 干扰组 (EPCR siRNA 转染+脂质体 2000 处理组)、无关序列组 (无关序列 siRNA 转染+脂质体 2000 处理组)及未处理组 (脂质体 2000 处理组)。

#### 1.1.2 EPCR siRNA 片段

针对人 EPCR mRNA (NM\_006404) 的 siRNA 片段 GCACUCGGUAUGAACUGCGGAAAU 及无关序列 siRNA 购自美国 Invitrogen 公司。

#### 1.1.3 实验试剂

兔抗人 EPCR 单克隆抗体 (AF2245, R&D 公司, 美国), 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (TA-08, 北京中杉公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司, 美国), Leibovitz's L-15 培养基 (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (Helycon 公司, 美国); EPCR siRNA 片段、无关序列 siRNA 片段、Lipofectamine 2000 转染试剂和 optiMEM (Invitrogen 公司, 美国); CCK-8 试剂盒 (株式会社同仁化学, 日本), Transwell 小室 (Millipore 公司, 美国), Matrigel 胶 (BD 公司, 美国); TRIzol 试剂盒、反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒 (北京天根生化公司), 核酸电泳试剂 (Biotium 公司, 美国), Western blot 试剂盒 (杭州碧云天公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

分别用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基和 L-15 培养基培养 HUVECs 和 MDA-MB-231 细胞, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内培养。

#### 1.2.2 制备肿瘤条件培养基

MDA-MB-231 细胞转染按 Lipofectamine 2000 操作说明进行, 24 孔板 EPCR siRNA 及无关序列 siRNA 用量为 40 pmol。实验分为 EPCR 干扰组、无

关序列组和未处理组。转染 48 h 后, 收集上清, 无菌操作离心去细胞碎片, 得到肿瘤细胞培养上清液, 按照肿瘤上清: DMEM 培养基: 胎牛血清=4:5:1 制成肿瘤条件培养基。

#### 1.2.3 RT-PCR 检测

总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂盒操作说明进行, 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的完整性。反转录依照试剂盒操作说明进行。取 2 μl cDNA 产物加入 25 μl PCR 反应体系进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。EPCR (340 bp) 和 β-actin (267 bp) 引物由上海生工生物工程有限公司合成, EPCR: 上游 5'-CCAACAACCACGATCATTGAG-3', 下游 5'-ATACCGAGTGGGTTGTAGG-3'; β-actin: 上游 5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTC-3', 下游 5'-CAGT-CATCCCCTTAA-3'。

#### 1.2.4 Western blot 检测

采用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 加入兔抗人 EPCR 单克隆抗体 (1:1 000) 和鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (1:500), 4℃ 过夜, 二抗室温孵育 2 h, 最后采用化学发光法检测目的条带, 并采用 Image J 图像分析系统对 Western blot 结果进行分析。

#### 1.2.5 细胞增殖能力检测

取对数生长期的 HUVECs 细胞, 按 3 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔培养板, 加入制备的各组肿瘤条件培养基, 培养后 24、48 和 72 h 在每孔中加入 10 μl WST-8, 继续培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 吸光度值。

#### 1.2.6 细胞迁移能力检测

取对数生长期的 HUVECs 细胞, 按 8 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种至 Transwell 小室的上室, 下室内加入制备的各组肿瘤条件培养基。培养 24 h 后 PBS 冲洗 2 次, 甲醇固定 30 min, 晾干后于 1% 结晶紫中染色 25 min。倒置显微镜下每孔随机取 10 个视野, 计算穿至小室膜下的细胞数。

#### 1.2.7 Matrigel 胶小管形成实验

96 孔培养板中加入 Matrigel 胶, 置于 37℃ 温箱中包被 30 min 使其凝固, 待胶凝固后加入制备好的肿瘤条件培养基和 HUVECs 细胞悬液, 培养 8 h, 相差显微镜下每孔取 4 个视野, 计算小管数。

### 1.3 统计学方法

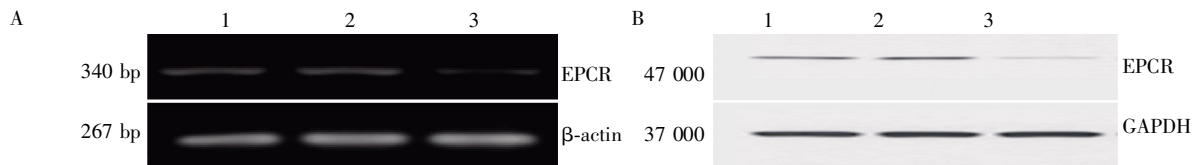
检测结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差进行分析, 每个实验至少重复 3 次。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MDA-MB-231 细胞 EPCR 表达的干扰效果

细胞转染后,采用 RT-PCR 技术检测各组 MDA-MB-231 细胞中 EPCR 基因的表达水平。提取的总 RNA 经电泳观察后取 1  $\mu$ g 进行反转录,然后取 2  $\mu$ l 反转录产物进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5%

的琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见 1 条清晰的 340 bp 的 EPCR 扩增带和 267 bp 的  $\beta$ -actin 扩增带,产物大小与理论大小相符。比较各组与对应内参的灰度值,结果表明,与无关序列组及未处理组相比,EPCR 干扰组可见明显 EPCR mRNA 的表达降低(图 1A)。EPCR 干扰组细胞中的 EPCR 蛋白较无关序列组及未处理组细胞表达降低(图 1B)。



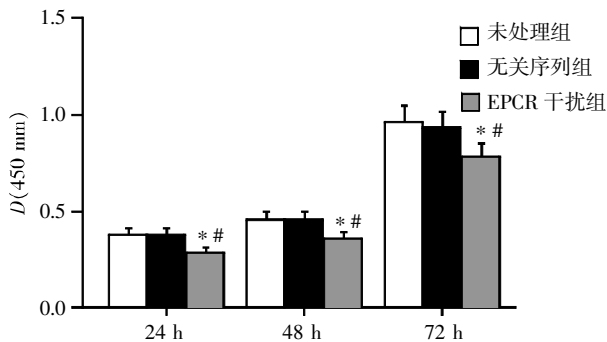
A: EPCR mRNA 的表达; B: EPCR 蛋白的表达。1: 未处理组; 2: 无关序列组; 3: EPCR 干扰组。

图 1 不同处理组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 EPCR mRNA 和 EPCR 蛋白的表达

Figure 1 The EPCR mRNA transcription and protein expression in MDA-MB-231 cells by different treatments

### 2.2 干扰 EPCR 表达对 HUVECs 细胞增殖的影响

分别于细胞培养 24、48、72 h 后检测 3 组细胞的吸光度值,随时间延长,吸光度值逐渐增高,72 h 达高峰;在相同时间点内 EPCR 干扰组的吸光度值明显低于无关序列组及未处理组( $P < 0.01$ ,图 2);而在相同时间点内无关序列组与未处理组相比,吸光度值差异不明显( $P > 0.05$ ,图 2)。



与未处理组比较, \* $P < 0.01$ ; 与无关序列组比较, # $P < 0.01$ 。

图 2 不同处理组 HUVECs 细胞的增殖

Figure 2 Proliferation of HUVECs by different treatments

### 2.3 干扰 EPCR 表达对 HUVECs 细胞迁移的影响

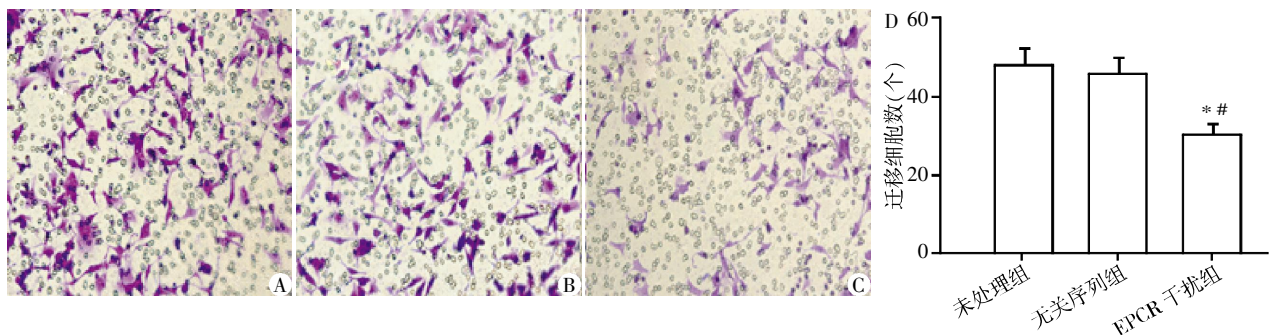
3 组细胞中均检测到有不同数量的 HUVECs 细胞发生迁移,EPCR 干扰组迁移出的细胞数量较无关序列组与未处理组均明显减少( $P < 0.01$ ,图 3);而无关序列组与未处理组相比,迁移出的细胞数量无明显差异( $P > 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 干扰 EPCR 表达对 HUVECs 细胞体外形成小管数的影响

未处理组和无关序列组细胞形成的小管数较多,二者相比无明显差异( $P > 0.05$ ,图 4);EPCR 干扰组细胞形成的小管数明显低于未处理组及无关序列组( $P < 0.01$ ,图 4)。

## 3 讨论

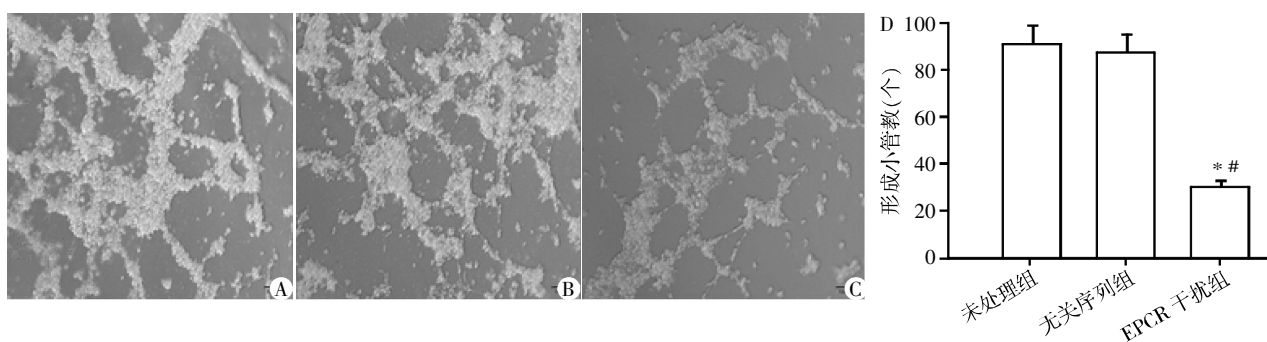
EPCR 是 1994 年 Fukcdome 等<sup>[1]</sup>利用内皮细胞基因文库采取克隆表达技术,得到的能够编码蛋白 C 结合位点的蛋白,蛋白分子量为 47 000。编码人的 EPCR 基因位于第 20 号染色体长臂(20q11.2),基



A~C: 结晶紫染色显示不同处理组 HUVECs 细胞迁移数( $\times 200$ )。A: 未处理组; B: 无关序列组; C: EPCR 干扰组。D: 各组迁移细胞数统计结果。与未处理组比较, \* $P < 0.01$ ; 与无关序列组比较, # $P < 0.01$ 。

图 3 不同处理组 HUVECs 细胞迁移数

Figure 3 The migration HUVECs in different treatment groups



A~C:不同处理组 HUVECs 细胞形成小管数( $\times 100$ )。A:未处理组 B:无关序列组 C:EPCR 干扰组。D:各组形成小管数统计结果。与未处理组比较,\* $P < 0.01$ ;与无关序列组比较,# $P < 0.01$ 。

图4 不同处理组 HUVECs 细胞形成小管数

Figure 4 The tube formation number of HUVECs in different treatment groups

因组全长约 6 kb,包括 4 个外显子、3 个内含子以及 5'和 3'端的侧翼区结构,具有高度保守的 Arg-Arg-Cys 序列,它对决定 EPCR 的胞内分布具有重要意义。EPCR 可分布于胞膜和细胞器(如小凹)上,甚至进入细胞核。当半胱氨酸突变为丝氨酸时,EPCR 只在胞膜表达。最初研究发现,EPCR 特异性表达在大血管内皮细胞、人支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞表面。细胞膜上的属于结合型 EPCR,血浆中还存在可溶性 EPCR(sEPCR),其血浆浓度约为 100 ng/ml,同样具有与 PC/APC 结合的能力,但与 APC 结合后由于构象改变不再具有灭活 FV $\alpha$  的功能。后来研究发现 EPCR 可在多种肿瘤细胞中表达,如急性单核细胞白血病细胞株 U937、恶性胶质瘤细胞株 U87、T98G 和肺腺癌细胞株 A549,免疫组化显示在乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌和肾癌中也有表达<sup>[2-4]</sup>。

通过 EPCR 干扰技术特异性抑制肺癌细胞的表达后,发现肿瘤细胞的增殖能力明显降低<sup>[5]</sup>,表明在该肿瘤组织中 EPCR 可能促进肿瘤细胞的生长。然而另有研究发现,在胸腔腔内,组织因子(tissue factor,TF)及蛋白酶活化受体 1(protease-activated receptors-1,PAR-1)阳性表达而 EPCR 基因及 PAR-2 弱表达或不表达的恶性胸膜间皮瘤细胞能够产生较大的肿瘤;EPCR 及 PAR-1 阳性表达而 TF 弱表达的非侵袭性间皮瘤细胞致瘤性并不增加。EPCR 能够抑制有 TF 表达的肿瘤细胞的生长<sup>[6]</sup>。有研究报道 APC 可以活化 MDA-MB-231 乳腺癌细胞表面的 PAR-1 来促进其迁移,并且在 HUVECs 中,APC 能够通过 EPCR/APC/PAR-1 信号通路加强内皮细胞的活性和管道形成能力<sup>[7-9]</sup>。但也有研究报道 EPCR 通过结合 APC 能够减少介导肿瘤细胞与内皮细胞相互作用的黏附分子的表达,从而达到抑制肿瘤细胞黏附与迁移的作用<sup>[10-12]</sup>。通过建立肺癌模型,抑制 EPCR

的表达或阻断 APC/EPCR 的相互作用,可抑制肿瘤细胞转移,另外,EPCR 高表达时,可促进肿瘤细胞向目标器官转移<sup>[13-14]</sup>。通过建立体外细胞模型发现,EPCR 通过 EPCR/APC/PAR-1 信号通路可能促进乳腺癌细胞的迁移、浸润及血管形成<sup>[15]</sup>。综上所述,EPCR 在恶性肿瘤发生发展中的作用还没有明确结论。这些研究均表明 EPCR 与肿瘤的发生、发展密切相关,但是肿瘤细胞高表达 EPCR 是否可以影响肿瘤血管的形成未见报道。

本研究成功建立 MDA-MB-231 细胞 EPCR 干扰模型,将制备的肿瘤条件培养基作用于 HUVECs 后,与无关序列组和未处理组相比,细胞增殖能力明显降低,穿过 Transwell 小室膜上 8  $\mu$ m 小孔的细胞数目以及 Matrigel 基质胶上小管形成数目均明显减少,说明 MDA-MB-231 细胞 EPCR 表达有可能影响肿瘤血管的形成。

#### [参考文献]

- [1] Fukudome K,Esmon CT. Molecular cloning and expression of murine and bovin endothelial cell protein C/activated protein C receptor[J]. J Bio Chem,1995,270(10): 5571-5577
- [2] 衡伟,王兆钺. 内皮蛋白 C 受体及其病理与临床意义[J]. 国际输血及血液学杂志,2006,29(1):9-12
- [3] Tsuneyoshi N,Fukudome K,Horiguchi S,et al. Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor(EPCR)in cancer cell lines[J]. Thromb Haemost,2001,85(2):356-361
- [4] Shu F,Kobayashi H,Fukudome K,et al. Activated protein C suppresses tissue factor expression on U937 cells in the endothelial cell protein C receptor-dependent manner[J]. FEBS Lett,2000,477(3):208-212
- [5] 衡伟,王兆钺,白霞,等. 肺癌细胞系内皮蛋白 C 受体的表达及其意义[J]. 苏州大学学报:医学版,2006,26

- (5):5
- [6] Keshava S,Sahoo S,Tucker TA,et al. Endothelial cell protein C receptor opposes mesothelioma growth driven by tissue factor[J]. *Cancer Res*,2013,73(13):3963-3973
- [7] Beaulieu LM,Church FC. Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1[J]. *Exp Cell Res*,2007,313(4):677-687
- [8] Gramling MW,Beaulieu LM,Church FC. Activated protein C enhances cell motility of endothelial cells and MDA-MB-231 breast cancer cells by intracellular signal transduction[J]. *Exp Cell Res*,2010,316(3):314-328
- [9] Ye X,Fukudome K,Tsuneyoshi N,et al. The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries,veins,and capillaries[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1999,259(3):671-577
- [10] Taylor FB Jr,Peer GT,Lockhart MS,et al. EPCR plays an important role in protein C activation *in vivo* [J]. *Blood*,2001,97(6):1685-1688
- [11] Centelles MN,Puy C,Lopez-Sagaseta J,et al. Blocking endothelial protein C receptor (EPCR) accelerates thrombus development *in vivo* [J]. *Thromb Haemost*,2010,103(6):1239-1244
- [12] Bezuhly M,Cullen R,Esmon CT,et al. Role of activated protein C and its receptor in inhibition of tumor metastasis [J]. *Blood*,2009,113(14):3371-3374
- [13] Anton I,Molina E,Luis-Ravelo D,et al. Receptor of activated protein C promotes metastasis and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2012,186(1):96-105
- [14] Heng W,Huang JA,Wang ZY. Inhibition of cellular growth and migration by suppression of endothelial protein C receptor (EPCR) in lung carcinoma cells [J]. *Oncol Res*,2012,20(5-6):231-240
- [15] Xue M,Minhas N,Chow SO,et al. Endogenous protein C is essential for the functional integrity of human endothelial cells [J]. *Cell Mol Life Sci*,2010,67(9):1537-1546
- [收稿日期] 2014-07-24

(上接第308页)

- treatment of locally advanced esophageal cancer [J]. *Oncology*,2011,81(5-6):387-394
- [9] Gening LV,Grishina EE,Petrochenkov AN,et al. Association between high activity of DNA polymerase iota and the development of human uveal melanoma [J]. *Genetika*,2006,42(1):98-103
- [10] Yang J,Chen Z,Liu Y,et al. Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis [J]. *Cancer Res*,2004,64(16):5597-5607
- [11] 赵谦,杨劲,金锡御,等. Polu与移行细胞癌发生关系的实验研究[J]. *现代生物医学进展*,2007,7(10):1513-1516
- [12] 朱峰,田辉,岳韦名,等. Polu基因在人肺癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2009,16(5):503-506
- [13] 张洪典,陈传贵,岳杰,等. 淋巴结转移数目和淋巴结转移率对食管胃结合部腺癌根治术后预后的影响[J]. *中华肿瘤杂志*,2014,36(2):141-146
- [14] Jarrett SG,Novak M,Dabernat S,et al. Metastasis suppressor NM23-H1 promotes repair of UV-induced DNA damage and suppresses UV-induced melanomagenesis [J]. *Cancer Res*,2012,72(1):133-143
- [15] Ren HZ,Wang JS,Pan GQ,et al. Comparative proteomic analysis of beta-catenin-mediated malignant progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dis Esophagus*,2010,23(2):175-184
- [收稿日期] 2014-08-11