

Osterix 通过上调 LOX 的表达促进人乳腺癌细胞的迁移和侵袭

吴佳慧,姚 兵,水一方,金玉翠,马长艳*

(南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 211166)

[摘要] **目的:**探讨 Osterix(Osx)对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的影响及其潜在机制。**方法:**采用荧光实时定量 PCR(Real-time PCR)及 Western blot 技术检测 Osx 过表达及敲低稳转细胞(231-OE6、231-OEC、231-KD2、231-KDC)中赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)的表达水平;转染 LOX siRNA 及其对照至 Osx 过表达稳转细胞(231-OE6)中,Transwell 检测细胞的迁移及侵袭能力;同时转染 LOX 过表达质粒及其对照至 Osx 敲低稳转细胞(231-KD2)中,Transwell 检测细胞的迁移及侵袭能力。**结果:**与各自对照相比,LOX 在 231-OE6 中表达显著升高,在 231-KD2 中表达显著降低($P<0.05$);降低 LOX 的表达能够显著削弱 231-OE6 细胞的迁移和侵袭能力,增加 LOX 的表达能够显著提高 231-KD2 细胞的迁移和侵袭能力,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**在乳腺癌细胞中 Osx 能够上调 LOX 的表达,且 Osx 通过上调 LOX 的表达而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

[关键词] Osx;LOX;乳腺癌;迁移;侵袭

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-665-04

doi:10.7655/NYDXBNS20170603

Osterix promotes the migration and invasion of human breast cancer cells by up-regulating LOX expression

Wu Jiahui, Yao Bing, Shui Yifang, Jin Yucui, Ma Changyan*

(Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the roles and the potential underlying molecular mechanisms of Osterix(Osx) on the migration and invasion of breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods:** Real-time PCR and Western blot assay were performed to detect the expression levels of lysyl oxidase (LOX) in Osx stably transfected or knocked down cells as well as in their corresponding control cells (231-OE6, 231-OEC, 231-KD2, and 231-KDC). The migration and invasion of 231-OE6 cells transfected with LOX siRNA and 231-KD2 cells transfected with LOX expression plasmids were detected by Transwell assays. **Results:** Compared to their corresponding control cells, the expression of LOX was increased in 231-OE6 cells, and decreased in 231-KD2 cells($P<0.05$). Knockdown of LOX in 231-OE6 cells attenuated the increased migration and invasion. Conversely, overexpression of LOX in 231-KD2 cells rescued the decreased migration and invasion ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of LOX is up-regulated by Osx in human breast cancer cells, and it promotes the migration and invasion of breast cancer cells.

[Key words] Osx; LOX; breast cancer; migration; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(06):665-668, 680]

乳腺癌是严重威胁全球女性生命健康的恶性肿瘤之一^[1],是导致全球女性死亡的第二大原因^[2]。近年来,我国乳腺癌发病率快速上升,已经成为我国女性发病率和病死率最高的恶性肿瘤^[3]。转移是导致乳腺癌患者死亡的主要原因,一旦发生转移,预后较差,5年生存率仅为20%^[4]。因此针对乳腺癌转移的分子机制研究,寻找潜在的诊断标志物和治疗靶点

具有十分重要的临床意义。

Osterix(Osx)是成骨细胞分化和骨发育必需的含有锌指结构的SP家族转录因子^[5]。本课题组先前研究表明,Osx可能参与了人乳腺癌的转移过程^[6]。另有研究表明赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)也与乳腺癌的骨转移密切相关^[7]。但是目前对Osx在乳腺癌转移中的具体机制尚不十分清楚。本文旨在研究LOX在Osx促进乳腺癌细胞迁移和侵袭中的作用,初步探索Osx促进乳腺癌转移的机制,进而为乳腺癌的诊断和治疗提供潜在的分子靶点。

[基金项目] 国家自然科学基金(81372320,81570804,81502303)

*通信作者(Corresponding author),Email: cyma@njmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自美国 American Type Culture Collection; DMEM 培养基、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 美国), ViaFectTM 转染试剂 (Promega 公司, 美国); 二甲亚砜 (DMSO)、结晶紫染液、多聚甲醛、PBS (Gibco 公司, 美国); Transwell 小室 (Millipore 公司, 美国); 兔抗 Sp7 /O_{sx} 多克隆抗体、兔抗 LOX 单克隆抗体 (Abcam 公司, 美国), 相应二抗 (Sigma 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.2.2 O_{sx} 单克隆稳转细胞系的构建

O_{sx} 过表达慢病毒 (O_{sx}-HA-T2A-GFP-PURO) 由上海生博生物医药科技有限公司包装, O_{sx} RNA 干扰慢病毒 (O_{sx}/GV248RNAi) 由上海吉凯基因有限公司包装。选择的 3 个干扰靶点序列分别为: O_{sx}/GV248RNAi-2: 5'-AAGCACTAATGGGCTCCTT-3'; O_{sx}/GV248RNAi-3: 5'-CAAGATGTCTATAAACCCA-3'; O_{sx}/GV248RNAi-4: 5'-TCAGGCTATGCTAATGATT-3'。感染前 1 d, 接种 MDA-MB-231 细胞 (5×10⁴ 个/孔) 至 6 孔板中, 加入 2 mL 含血清培养基, 培养至 15%~20% 融合度; 吸弃培养基, 加入 2 mL 新鲜培养基, 然后分别加入 O_{sx} 过表达、O_{sx} 干扰及各自对照病毒液 (均为 50 μL, 病毒滴度均为 1×10⁸ TU/mL), 最后再加入 0.5 μL Polybrene (浓度为 0.5 g/L)。24 h 后更换新鲜培养基; 继续培养 72 h 后荧光显微镜下观察病毒感染情况。然后将细胞消化接种至 24 孔板。细胞贴壁后加入含 1 μg/mL 嘌呤霉素的 RPMI 1640 完全培养基进行筛选, 隔天用 PBS 液清洗 2 遍, 洗去漂浮细胞后更换含相同浓度嘌呤霉素的培养液。1 周之后, 消化细胞制成单细胞悬液, 接种至 96 孔板, 贴壁后荧光显微镜下观察。之后挑选有荧光的单克隆细胞并编号进行扩大培养, 1 周后进行单克隆稳转细胞的鉴定和冻存。最终选择的 O_{sx} 过表达及敲低细胞株分别命名为 231-OE6、231-KD2, 相对应分别为 231-OEC、231-KDC。

1.2.3 细胞转染

选取生长状态良好的细胞, 转染前 24 h 将细胞

接种至 6 孔板, 每孔加 2 mL 细胞悬液, 细胞融合度至 50%, 采用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染 siRNA-LOX 及其对照 (Si-NC) 至 231-OE6 细胞中。同样, 选取生长状态良好的细胞, 转染前 24 h 将细胞接种至 6 孔板, 每孔加 2 mL 细胞悬液, 细胞融合度至 80%, 采用 ViaFect 转染试剂分别转染 LOX 表达质粒 (RK1) 及其对照 (RK1-LOX) 至 231-KD2 细胞中。

1.2.4 荧光实时定量 PCR (Real-time PCR)

Trizol 法提取细胞总 RNA, 采用随机引物将 1 μg RNA 反转为 cDNA。采用 FastStart DNAMaster SYBRGreen I 试剂盒进行 Real-time PCR。PCR 条件为: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。通过比较 Ct 值法 (2^{-ΔΔCt}) 进行相关定量分析。LOX 上游引物 5'-GGAACACAACAG AGTAT-GCG-3', 下游引物 5'-AAGGGGATGCCAGTGATGA-3'; 内参 β-actin 上游引物 5'-AGATGTG-GATCAGCAAGCAG-3', 下游引物 5'-GCCCAAGTTAG-GTTTTGTCA-3'。

1.2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot)

将变性的蛋白样品按 30 μg/孔, 加入预先制好的变性聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 的加样孔中; 电泳 60 min, 使样本中的蛋白分离。电泳结束后根据目的蛋白的大小, 将特定位置的胶条切至合适大小, 接通电源, 80 V 恒压, 根据不同蛋白分子量的大小选择合适的转膜时间。用 1×TBST 缓冲液配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 2% BSA 稀释一抗, 加入一抗 4 °C 孵育过夜; 1×TBST 缓冲液洗膜, 5 min×3 次; 分别加入 1×TBST 缓冲液配制的 3% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的抗兔或小鼠 IgG, 室温孵育 2 h; 1×TBST 缓冲液洗膜, 10 min×3 次; 洗膜结束后, 用 ECL 试剂进行曝光。预染的蛋白 marker 作为分子量标准。

1.2.6 细胞迁移实验

取对数生长期的细胞消化并用无血清 DMEM 培养基重悬后加入小室内, 每个小室细胞数量为 2×10⁴ 个。小室下层加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于细胞培养箱中培养 12 h 后取出小室, 弃去培养基, PBS 清洗 2 次后用多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色液室温染色 15 min, 用棉签擦去未穿膜细胞, 晾干, 在显微镜下随机选取 5 个视野拍照计数。

1.2.7 细胞侵袭实验

将 Matrigel 胶与无血清 DMEM 培养基按 1:4 比例稀释, 取 70 μL 稀释胶均匀铺于小室内, 于细胞培养箱中凝固 30 min 备用。取对数生长期的细胞消化并用无血清培养基重悬后加入小室内, 每个小室

细胞数量为 2×10^5 个。小室下层加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 胎牛血清的培养基,于细胞培养箱中培养 24 h 后取出,弃去培养基,PBS 清洗 2 次后用 4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色剂常温染色 15 min,用棉签擦去未穿膜细胞,晾干,在显微镜下随机选取 5 个视野拍照计数。

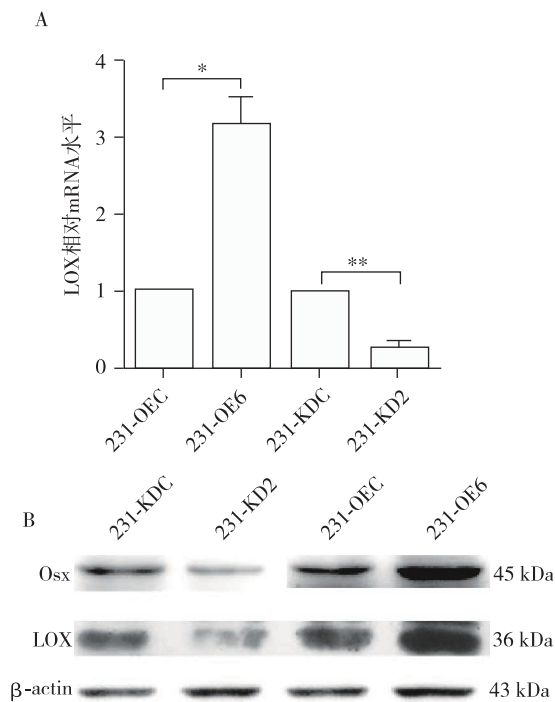
1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次,实验结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS15.0 统计软件分析。多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance),均数间的两两比较采用 LSD-*t* 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Osx 过表达或敲低细胞中 LOX 表达水平的变化

将 Osx 过表达及敲低的慢病毒稳转细胞以及各自对照细胞培养至对数生长期,提取各组细胞总 RNA,Real-time PCR 检测 Osx、LOX 的 mRNA 表达水平。结果显示 Osx 过表达后,LOX 表达水平升高($P < 0.01$,图 1A)。Western blot 结果同样显示,Osx 过表达细胞中 LOX 的蛋白水平与对照相比表达上调,Osx 敲低细胞中 LOX 的蛋白水平与对照相比下调(图 1B)。



A: LOX mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测 LOX 蛋白表达量。两组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。

图 1 Osx 稳转细胞系中 LOX 的表达量

Figure 1 The expression of LOX in Osx stably transfected cells

2.2 干扰 LOX 表达对 Osx 过表达稳转细胞迁移及侵袭能力的影响

为了解转染 LOX siRNA 后对 Osx 过表达稳转细胞迁移及侵袭能力的影响,进行了转染后 Transwell 实验。结果显示,Osx 过表达稳转细胞转染 LOX siRNA 后迁移和侵袭能力明显降低,差异有统计学意义($P < 0.001$,图 2)。

2.3 过表达 LOX 对 Osx 敲低稳转细胞迁移及侵袭能力的影响

将 LOX 表达质粒及其对照质粒转染 Osx 敲低稳转细胞后,对 2 组细胞进行 Transwell 实验。结果显示,与 Osx 敲低稳转细胞(对照)相比,转染 LOX 表达质粒组细胞迁移和侵袭能力明显提高,差异有统计学意义($P < 0.001$,图 3)。以上结果提示 Osx 通过上调 LOX 的表达而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

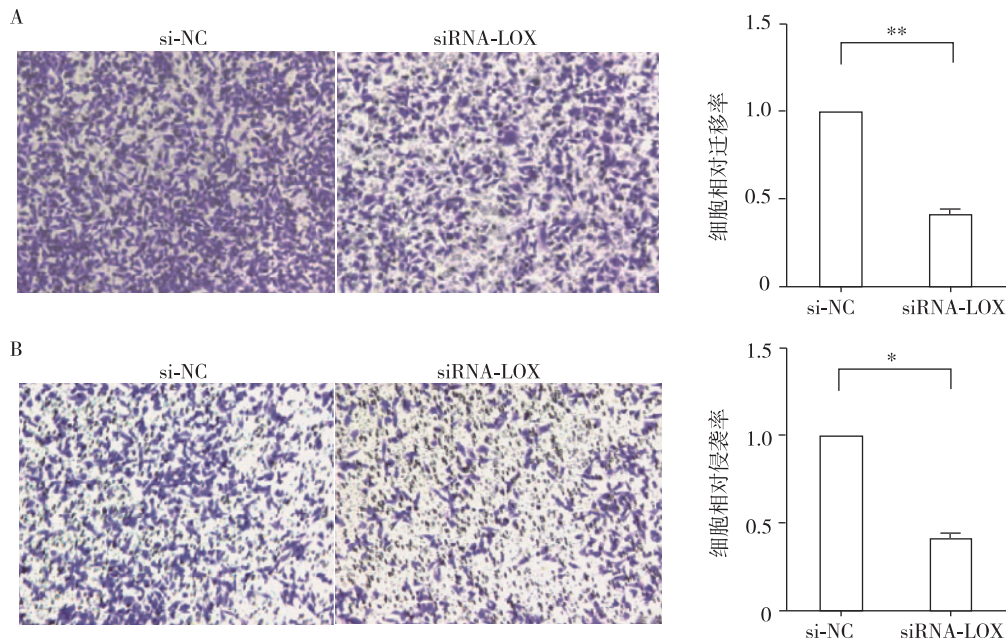
3 讨论

肿瘤转移是导致肿瘤相关死亡的主要原因^[8]。虽然只有 5%~10% 的早期乳腺癌确诊患者出现远处转移,但原发肿瘤患者在肿瘤切除术和辅助化疗后发生转移的机率依旧很高^[9]。乳腺癌细胞的迁移、侵袭是其转移的前期步骤,因此阐明乳腺癌发生迁移侵袭并最终转移的确切机制成为转移研究的重要内容^[10]。

Osx 是成骨细胞分化成熟过程中的重要调节因子^[11-13]。然而最近研究表明 Osx 的表达并不限于骨组织,在转移性肾癌和肺癌中也有相关报道^[14]。这表明 Osx 在这些癌症的进展中具有潜在作用。另有研究发现 Osx 在高转移性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MDA-MB-361 中呈高表达,而在低转移性的乳腺癌细胞 MCF-7 中几乎不表达,进一步提示 Osx 在乳腺癌转移中可能发挥重要作用^[15]。

为了进一步探讨 Osx 调控乳腺癌转移的潜在机制,本研究分别采用 Real-time PCR、Western blot 技术检测 Osx 与 LOX 在乳腺癌细胞中的表达情况,并采用 Transwell 技术检测 Osx 稳转细胞系中干扰或过表达 LOX 后细胞的迁移与侵袭能力。结果表明,在乳腺癌细胞中 LOX 的表达受 Osx 调控,且 Osx 通过上调 LOX 的表达而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

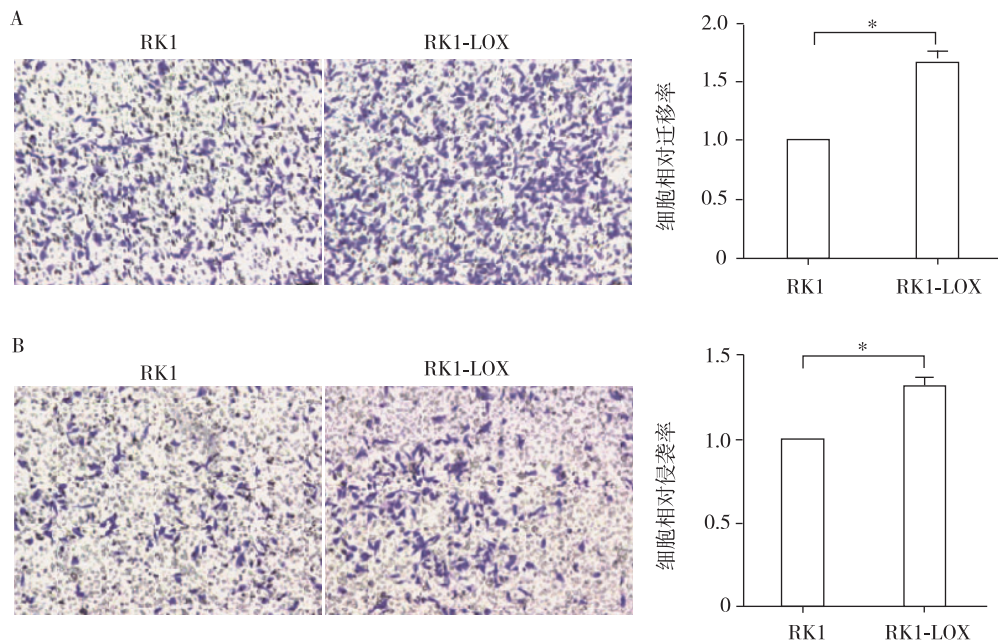
综上所述,随着对 Osx 基因功能研究的不断深入,其在肿瘤中的作用将会逐渐清晰,有望成为一个新的肿瘤治疗靶点。本研究在细胞水平考察了 Osx 促进乳腺癌细胞迁移和侵袭的分子机制,为 Osx 作为乳腺癌转移治疗的新靶点提供了理论和实验依据。



A:231-OE6 细胞的相对迁移能力;B:231-OE6 细胞的相对侵袭能力。两组比较,* $P<0.001$,** $P<0.0001$ 。

图 2 降低 LOX 的表达削弱 231-OE6 细胞的迁移和侵袭能力

Figure 2 Knockdown of LOX impairs the migration and invasion of 231-OE6 cells



A:231-KD2 细胞的相对迁移能力;B:231-KD2 细胞的相对侵袭能力。两组比较,* $P<0.001$ 。

图 3 过表达 LOX 增强 231-KD2 细胞的迁移和侵袭能力

Figure 3 Overexpression of LOX enhances the migration and invasion of 231-KD2 cells

[参考文献]

- [1] Atoum MF, Alzoughool F. Reduction in breast cancer susceptibility due to *Xba*I gene polymorphism of alpha estrogen receptor gene in Jordanians [J]. Breast Cancer (London), 2017, 9:45-49
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29
- [3] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of incidence and mortality in China Cancer Registries [J]. Cancer Res, 2013, 25(1): 10-21
- [4] Zhang X, Ren D, Guo L, et al. Thymosin beta 10 is a key regulator of tumorigenesis and metastasis and a novel (下转第 680 页)

- [12] Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, et al. Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4):L527-L535
- [13] Schaffner P, Dard MM. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(1):119-132
- [14] Taubenberger AV, Woodruff MA, Bai H, et al. The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(10):2827-2835
- [15] Zhou J, Ding J, Nie B, et al. Promotion of adhesion and proliferation of endothelial progenitor cells on decellularized valves by covalent incorporation of RGD peptide and VEGF[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27(9):142
- [16] Tao GZ, Rott LS, Lowe AW, et al. Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(22):19295-19303
- [17] Zhu M, Wen M, Sun X, et al. Propofol protects against high glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Anesth Analg*, 2015, 120(4):781-789
- [18] Costantino S, Paneni F, Luescher TF. Pin1 inhibitor Juglone prevents diabetic vascular dysfunction[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 203:702-707
- [19] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22(3):198-203
- [20] 葛敏, 蒋朝华, 戴婷婷, 等. 不同血清浓度对淋巴管内皮细胞培养的影响[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2013, 9(3):121-124
- [21] 杨雷, 何秋莎. 兔血清浓度对肝癌细胞系 2.2.15 细胞培养的影响[J]. *温州医学院学报*, 2000, 30(3):223
- [22] Ge D, Meng N, Su L, et al. Human vascular endothelial cells reduce sphingosylphosphorylcholine-induced smooth muscle cell contraction in co-culture system through integrin $\beta 4$ and Fyn[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1):57-65
- [23] Shaidakov EV, Evlakhov VI. Role of the endothelium in pathogenesis of chronic postembolic pulmonary hypertension[J]. *Angiol Sosud Khir*, 2016, 22(1):22-27
- [24] Goldthorpe H, Jiang JY, Taha M, et al. Occlusive lung arterial lesions in endothelial-targeted, Fas-induced apoptosis transgenic mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(5):712-718
- [25] Goldenberg NM, Kuebler WM. Endothelial cell regulation of pulmonary vascular tone, inflammation, and coagulation[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2):531-559

[收稿日期] 2016-08-09

(上接第 668 页)

- serum marker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1):15
- [5] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel Zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1):17-29
- [6] Salinas-Souza C, De Oliveira R, Alves MT, et al. The metastatic behavior of osteosarcoma by gene expression and cytogenetic analyses[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(10):2188-2198
- [7] Cox TR, Rummey RM, Schoof EM, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase[J]. *Nature*, 2015, 522 (7554):106-110
- [8] Costa R, Carneiro BA, Wainwright DA, et al. Developmental therapeutics for patients with breast cancer and central nervous system metastasis: current landscape and future perspectives[J]. *Ann Oncol*, 2016, 28(1):44-56
- [9] Gao Y, Xie J, Chen H, et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(4):761-777
- [10] 龙芷源, 王庭槐. Ezrin 蛋白在乳腺癌细胞迁移侵袭中的作用的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2016, 47(1):21-26
- [11] Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1):21-28
- [12] Chatani M, Morimoto H, Takeyama K, et al. Acute transcriptional up-regulation specific to osteoblasts/osteoclasts in medaka fish immediately after exposure to microgravity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:39545
- [13] Wang Y, He T, Liu J, et al. Synergistic effects of overexpression of BMP-2 and TGF- $\beta 3$ on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6):5514-5520
- [14] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8):895-904
- [15] Dai QS, Zhou HY, Wu ZH, et al. Osterix transcriptional factor is involved in the metastasis of human breast cancers[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3):1870-1874

[收稿日期] 2017-02-12