

论著·基础研究

CD147 基因沉默抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的作用机制汪成^{1,2}, 庄志刚³, 单鸣¹, 徐明⁴1. 上海市黄浦区中心医院乳腺外科, 上海 200002; 2. 同济大学医学院, 上海 200092; 3. 同济大学附属第一妇幼保健院乳腺外科, 上海 200050;
4. 上海市黄浦区中心医院病理科, 上海 200002

[摘要] 目的· 探讨 CD147 基因沉默对三阴性乳腺癌细胞的增殖抑制作用及机制。方法· 体外培养人正常乳腺上皮细胞 HMEC 及 3 株三阴性乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231、HCC70 和 T4-2), 采用 real-time PCR 和 Western blotting 分别检测细胞内 CD147 mRNA 和蛋白表达。设计针对人 CD147 基因编码区的 siRNA 序列, 构建重组慢病毒 Lv-shRNA-CD147 并感染乳腺癌细胞, 设立阴性对照 (Lv-NC 感染组) 和不感染细胞对照 (细胞对照组)。采用 real-time PCR 和 Western blotting 检测 CD147 基因沉默效果; 采用 MTT 法和 Transwell 试验分别检测细胞增殖活性和细胞迁移能力。收集病毒感染后 72 h 的 HCC70 细胞, 采用 Western blotting 检测细胞内增殖、迁移、凋亡相关蛋白 (β -catenin, MMP2, MMP9 和 Bax) 的表达。**结果**· 3 株乳腺癌细胞中 CD147 mRNA 及蛋白的表达均显著高于 HMEC 细胞 ($P<0.01$)。与 Lv-NC 感染组和细胞对照组比较, Lv-shRNA-CD147 感染组 CD147 mRNA 和蛋白表达下调, 细胞增殖活性降低, 细胞迁移能力减弱, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。病毒感染后 72 h, 与相应的 Lv-NC 感染组和细胞对照组比较, Lv-shRNA-CD147 感染组 HCC70 细胞内 β -catenin, MMP2, MMP9 表达降低, 而 Bax 表达增高, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。**结论**· CD147 基因沉默可以抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移。

[关键词] 三阴性乳腺癌; CD147; 基因沉默; 增殖; 迁移**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.03.006 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A**Mechanisms of inhibiting the proliferation of triple negative breast cancer cell lines by silencing the CD147 gene**WANG Cheng^{1,2}, ZHUANG Zhi-gang³, SHAN Ming¹, XU Ming⁴

1. Department of Breast Surgery, The Central Hospital of Huangpu District of Shanghai, Shanghai 200002, China; 2. Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 3. Department of Breast Surgery, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200050, China; 4. Department of Pathology, The Central Hospital of Huangpu District of Shanghai, Shanghai 200002, China

[Abstract] Objective· To explore the inhibitory effect of silencing the CD147 gene on the proliferation of triple negative breast cancer cells and relevant mechanisms. Methods· Normal human mammary epithelial cell line HMEC and three triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-231, HCC70 and T4-2 were cultured *in vitro*. mRNA and protein expressions in cells were measured using realtime-PCR and Western blotting, respectively. A siRNA sequence targeting the coding region of human CD147 gene was designed and used to construct a recombinant lentivirus Lv-shRNA-CD147, which was used to infect the three breast cancer cell lines. The negative control group (Lv-NC infected group) and the noninfected cell control group (cell control group) were simultaneously used. The effects of silencing the CD147 gene were measured with real-time PCR and Western blotting. The proliferation and migration of cells were measured with MTT and Transwell assay, respectively. HCC70 cells were collected 72 h after viral infection and proteins related to proliferation, migration and apoptosis of cells (β -catenin, MMP2, MMP9, and Bax) were measured with Western blotting. Results· mRNA and protein expressions of CD147 were significantly higher in three breast cancer cell lines than in HMEC ($P<0.01$). The Lv-shRNA-CD147 infected group had lower mRNA and protein expressions of CD147, cell proliferation, and cell migration as compared with the Lv-NC infected group and the cell control group, the differences were statistically significant ($P<0.01$). The Lv-shRNA-CD147 infected group had lower expressions of β -catenin, MMP2, and MMP9, and higher Bax expression in HCC70 cells 72h after viral infection as compared with the Lv-NC infected group and the cell control group, the differences were statistically significant ($P<0.01$). Conclusion· Silencing the CD147 gene can inhibit the proliferation and migration of triple negative breast cancer cells.

[Key words] triple negative breast cancer; CD147; gene silence; proliferation; migration

乳腺癌目前已成为威胁女性身心健康的主要恶性肿瘤之一。目前, 临床对于乳腺癌的治疗方法主要包括手术、化学治疗 (化疗)、放射治疗 (放疗)、内分泌治疗及基因靶向治疗等, 然而每种治疗方法都有其固有的缺陷。因

此, 寻找新的调控乳腺癌细胞生物学行为的关键基因, 明确特异蛋白分子在乳腺癌发病过程中的作用机制, 确定可用于临床治疗的分子靶标, 仍然是乳腺癌基础研究的重要方向。

[基金项目] 上海市卫生与计划生育委员会科研课题 (201540259) (Project of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission, 201540259)。**[作者简介]** 汪成 (1975—), 男, 副主任医师, 博士生; 电子信箱: wangcheng1212@hotmail.com。**[通信作者]** 庄志刚, 电子信箱: zhuang_zg@163.com。

近期乳腺癌与 CD147 的相关研究表明, CD147 在乳腺癌组织中呈现高表达, 主要表达于肿瘤细胞的胞膜和胞质^[1]。随着乳腺癌的进展, CD147 的表达不断升高, 与其临床侵袭能力相对应。CD147 是乳腺癌复发、转移的风险因子之一。伴有远处转移乳腺癌患者 CD147 蛋白表达显著高于未发生转移的患者。在细胞系中, 具有转移能力的细胞其 CD147 分子的表达要高于不具有转移能力的细胞^[2-3]。Kong 等^[4]发现, 核转录因子 Sp1 和 c-myc 可与 CD147 启动子结合而增强基因转录, 而通过表达 miRNA22 可以抑制其靶基因 CD147 的表达, 并最终抑制乳腺癌细胞的侵袭和转移。

虽然 CD147 在乳腺癌的发生和发展中有着重要的作用, 但相关研究并未对 CD147 基因在三阴性乳腺癌中的作用及机制深入探讨, 对于其中可能存在的三阴性乳腺癌高度侵袭性的分子机制也尚未阐明。本研究在三阴性乳腺癌细胞中靶向沉默 CD147, 观察其对细胞增殖、迁移及凋亡的影响, 同时对肿瘤细胞调控关键蛋白进行检测, 初步分析 CD147 调控三阴性乳腺癌细胞的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与主要试剂 人正常乳腺上皮细胞 HMEC 及三阴性乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231、HCC70 和 T4-2) 均购自美国模式菌种收集中心 (ATCC), RPMI1640 细胞培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS)、Lipofectamine 2000 转染试剂、TRIzol 及 M-MLV 反转录试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品, 蛋白初级抗体及二抗均为美国 Abcam 公司产品, 细胞及组织蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒均为 Pierce 公司产品, 噻唑蓝 (MTT) 和二甲基亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品, SYBR Green 荧光定量检测试剂盒为 TaKaRa 公司产品, 病毒表达载体及慢病毒包装实验系统购于美国 Systembio 公司, 细胞凋亡检测试剂盒为 BD 公司产品, 肿瘤细胞迁移检测试剂盒为 Millipore 公司产品。

1.1.2 仪器和设备 细胞培养箱 (MCO-15AC) 为日本三洋公司产品, 水平离心机、高速低温离心机及微量移液器为德国 Eppendorf 公司产品, 电泳仪、垂直电泳槽及转膜仪购于美国伯乐公司, 酶标仪 (Multiskan MK3) 为 Thermo 公司产品, 定量 PCR 仪 (TP800) 为 TaKaRa 公司产品, 流式细胞仪 (FACSCanto II) 为 BD 公司产品, 荧光倒置显微镜 (GX-71) 购自日本 Olympus 公司。

1.2 正常乳腺上皮细胞及乳腺癌细胞 CD147 表达检测

复苏培养 HMEC 细胞 (正常组) 及 DA-MB-231、HCC70、T4-2 细胞 (乳腺癌细胞组), 收集对数期细胞各 1×10^7 个, 分别提取各组细胞总 RNA 和细胞总蛋白, real-time-PCR 和 Western blotting 检测 CD147 mRNA 和蛋白表达。

1.2.1 Real-time PCR 检测 CD147 mRNA 表达 使用 TRIzol 处理细胞样本, 经酚氯仿法抽提细胞总 RNA, 取 2 μ g RNA, M-MLV 反转录制备 cDNA, 反转录使用 OligodT16, 将 2 μ L 反转录产物作为 PCR 反应模板, 荧光定量法检测 CD147 含量。PCR 反应引物序列: β -actin 上游引物 5'-CCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATG-3', 下游引物 5'-GTCCCCGCCAGCCAGGTCCAGA-3'; CD147 上游引物 5'-AAGTCGTCAGAACACATCAA-3', 下游引物 5'-AACCTGCTCTGGAG CCGTTC-3'。PCR 反应使用 20 μ L 体系, 其中, SYBR Premix Ex Tag 10 μ L, 引物 (20 μ mol/L) 各 0.2 μ L, 模板使用量为 2 μ L, 反应体系用 dH₂O 补足。PCR 反应条件: 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 循环数设置为 40。 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量结果, 内参选用 β -actin (NM_001101.3)。

1.2.2 Western blotting 检测 CD147 蛋白表达 细胞总蛋白经 BCA 法定量之后, 每组取 10 μ g 进行垂直电泳, SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶浓度为 11%, 经 110 V 电压 90 min 电泳后, 丽春红染色观察蛋白条带是否完整, 400 mA 电流转膜 90 min, 转膜后以 5% 的 BSA 封闭 2 h, 4 °C 一抗过夜孵育, CD147、 β -actin 一抗经 TBST 稀释 (1:200、1:1 200); TBST 洗膜 3 次, 加入二抗孵育 2 h, 羊抗鼠二抗稀释比为 1:3 000; TBST 洗膜 3 次, 添加化学发光液反应底物, 暗室曝光, 扫描曝光底片, 记录目的条带光密度值并计算相对表达量。

1.3 siRNA 表达载体构建及重组慢病毒制备

1.3.1 siRNA 表达载体构建 根据 CD147 (NM_001728.3) 的 RNA 序列信息, 使用在线软件设计针对序列的 siRNA。根据 siRNA 序列 (5'-GACCTTGGCTCCAAGATACTC-3') 设计 2 条互补双链, 模板链包括 shRNA 的正义链 (sense) 和反义链 (antisense) 及 RNA 聚合酶 III 转录终止位点 (TTTTT), 同时模板链两端分别添加 BamH I (GGATCC) 和 EcoR I (GAATTC) 酶切位点, 合成相应的 DNA 单链 (PAGE 级别)。合成好的互补双链经退火形成双链克隆至表达载体 pshRNA, 一组 siRNA 序列的错义序列 (5'-CGATCTAGACTCATCCGAGC-3') 作为阴性对照, 构建阴性对照载体。重组克隆经测序后进行无内毒素质粒



DNA 提取，提取过程严格按照试剂盒说明书进行，重组质粒分别命名为 pshRNA-CD147 和 pshRNA-NC。

1.3.2 重组慢病毒制备 复苏培养慢病毒包装细胞系 293TN，取对数生长期细胞，胰酶消化后经台酚蓝计数后，接种至 10 cm 培养皿，每皿接种 1×10^6 个细胞，使用 10 mL 含 10%FBS 的完全培养基，37 °C、5%CO₂ 条件下培养过夜。表达载体和病毒包装质粒的使用量分别为 2 μg 和 10 μg 每皿，转染试剂用量为 40 μL 每皿，转染过程严格按照 Lipofectmaine 2000 转染试剂说明书进行操作。转染后 48 h，收集细胞上清液，经 0.45 μm PVDF 膜过滤后通过梯度稀释法进行滴度测定，−80 °C 保存。2 组病毒分别命名为 Lv-NC 和 Lv-shRNA-CD147。

1.4 慢病毒感染、分组及鉴定

1.4.1 病毒感染乳腺癌细胞 取对数生长期的 3 株乳腺癌细胞，接种至 24 孔培养板，每孔 1×10^5 个细胞；正常条件下培养过夜后，使用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基对细胞进行换液；每组细胞分为 3 组——细胞对照组、Lv-NC 感染组和 Lv-shRNA-CD147 感染组；细胞对照组不添加病毒，病毒感染组按照细胞病毒感染复数 (MOI) 为 10 分别添加重组病毒，正常条件培养 24 h，使用完全培养基进行换液，继续培养 48 h。

1.4.2 鉴定检测 病毒感染后 72 h，荧光显微镜观察细胞绿色荧光蛋白 (GFP) 表达情况，并分析确定细胞感染效率；收集细胞，提取细胞总 RNA，real-time PCR 和 Western blotting 检测 CD147 mRNA 和蛋白表达 (步骤同 1.2)。

1.5 CD147 基因沉默对乳腺癌细胞的影响检测

1.5.1 细胞增殖活性检测 实验选用细胞对照组、Lv-NC 感染组 (感染后 72 h) 和 Lv-shRNA-CD147 感染组 (感染后 72 h) 的 MDA-MB-231 细胞。胰酶消化法制备细胞悬液，离心收集细胞沉淀，用含 10%FBS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞密度至 1×10^5 个/mL，接种细胞到 96 孔细胞培养板，每孔添加 100 μL 细胞悬液，轻晃培养板使其分布均匀，37 °C、5%CO₂ 条件下培养细胞，并于接种后的 24、48 和 72 h，MTT 法检测细胞增殖活性。每孔细胞加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL，轻晃使其分布均匀，继续培养 4 h，去上清，每孔加入 100 μL DMSO 溶液，37 °C 孵育 15 min，酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度值，根据吸光度值制作细胞对数期生长曲线。

1.5.2 细胞迁移能力检测 实验选用细胞对照组、Lv-NC

感染组 (感染后 72 h) 和 Lv-shRNA-CD147 感染组 (感染后 72 h) 的 T4-2 细胞。采用 Transwell 试验进行细胞侵袭能力检测，实验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.6 增殖、迁移、凋亡相关蛋白的表达检测

细胞总蛋白经 BCA 法定量之后，每组取 10 μg 进行垂直电泳，SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶浓度为 11%，经 110 V 电压 90 min 电泳后，丽春红染色观察蛋白条带是否完整，400 mA 电流转膜 90 min，转膜后以 5% 的 BSA 封闭 2 h，4 °C 下一抗过夜孵育，β-catenin、金属基质蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2)、MMP9、Bax 和 β-actin 一抗经 TBST 稀释 (1:460、1:60、1:400、1:500 和 1:1 200)，TBST 洗膜 3 次，加入二抗孵育 2 h，羊抗鼠二抗稀释比为 1:3 000；TBST 洗膜 3 次，添加化学发光液反应底物，暗室曝光，扫描曝光底片，记录目的条带光密度值并计算相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，多组资料两两比较采用 LSD-t 多重检验， $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

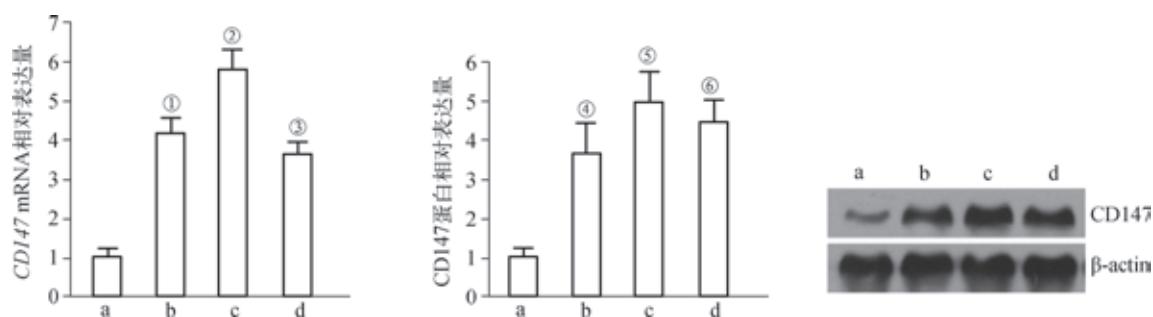
2.1 乳腺癌细胞与正常乳腺上皮细胞 CD147 表达

Real-time PCR 检测结果显示：乳腺癌各细胞组 CD147 mRNA 表达均显著高于正常组 ($P < 0.01$)，乳腺癌各细胞组 CD147 mRNA 表达的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；Western blotting 检测结果显示，CD147 蛋白在乳腺癌细胞组与正常组中的表达与 CD147 mRNA 的表达趋势完全一致 (图 1)。

2.2 乳腺癌细胞的慢病毒感染

荧光显微镜观察及分析结果显示 3 株乳腺癌细胞的基因转导效率均约 100% (图 2)。Real-time PCR 和 Western blotting 结果显示：病毒感染后 72 h，与细胞对照组和 Lv-NC 感染组比较，Lv-shRNA-CD147 感染组细胞内 CD147 mRNA 和蛋白的表达明显降低 ($P < 0.01$) (图 3)。通过与细胞对照组 CD147 mRNA 表达量的比值计算获得 MDA-MB-231、HCC70 和 T4-2 细胞内基因沉默效率分别为 78%、81% 和 82.8%，以蛋白表达计算的 MDA-MB-231、HCC70 和 T4-2 细胞内基因沉默效率分别为 82.6%、78.7% 和 82.1%。

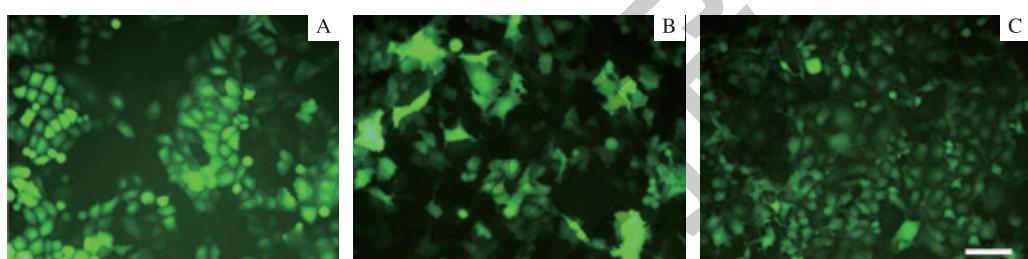




注: a. 正常组; b. 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞组; c. 乳腺癌 HCC70 细胞组; d. 乳腺癌 T4-2 细胞组。^① $P=0.006$, ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.004$, ^④ $P=0.032$, ^⑤ $P=0.008$, ^⑥ $P=0.010$, 与正常组比较。

图 1 乳腺癌细胞与正常乳腺上皮细胞 CD147 表达

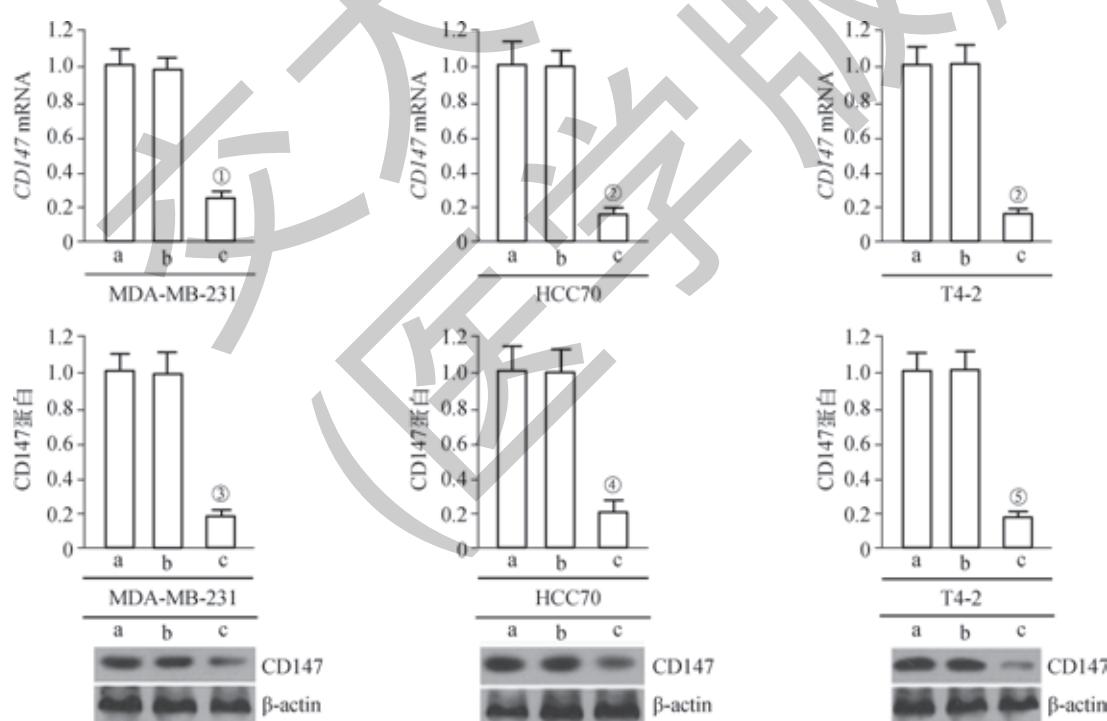
Fig 1 CD147 expression in breast cancer cells and normal HMECs



注: 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (A)、HCC70 细胞 (B)、T4-2 细胞 (C) 慢病毒感染 72 h 后荧光照片。

图 2 乳腺癌细胞病毒感染效率 (标尺 = 100 μm)

Fig 2 Infection efficiency of lentivirus in breast cancer cells (bar=100 μm)



注: a. 细胞对照组; b. Lv-NC 感染组; c. Lv-shRNA-CD147 感染组。^① $P=0.005$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.006$, ^④ $P=0.019$, ^⑤ $P=0.008$, 与 Lv-NC 感染组比较。

图 3 乳腺癌细胞基因沉默效率

Fig 3 Gene silencing efficiency in breast cancer cells

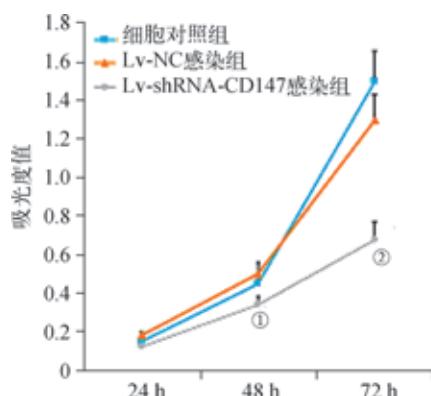
2.3 CD147 沉默对乳腺癌细胞增殖、凋亡及迁移的影响

MTT 检测结果显示: 在细胞重新接种后的 48 h 和

72 h, Lv-shRNA-CD147 感染组 MDA-MB-231 细胞增殖活

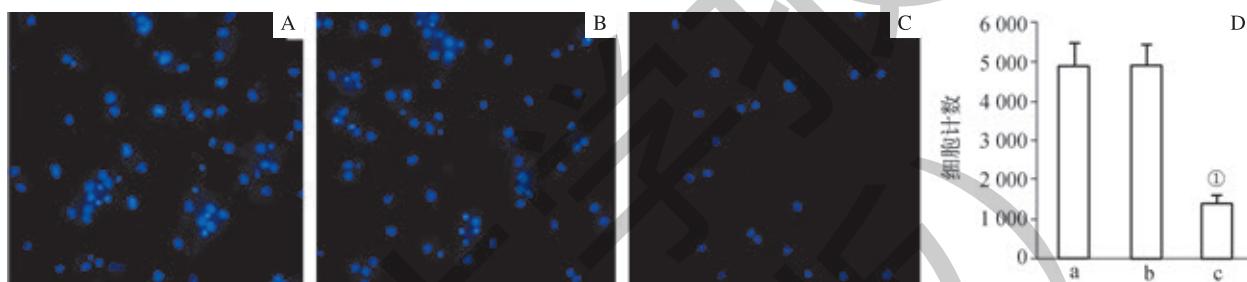
性明显低于细胞对照组或 Lv-NC 感染组 ($P<0.05$) (图 4)。





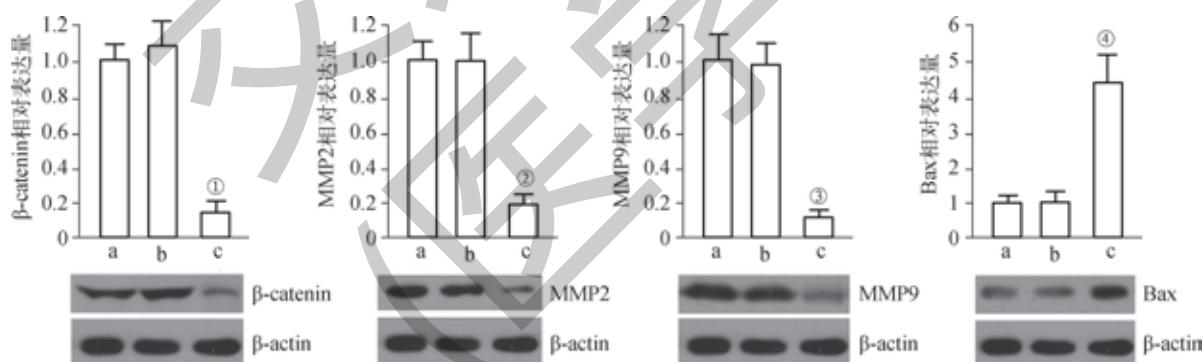
注: ^① $P=0.042$, ^② $P=0.006$, 与 Lv-NC 感染组比较。

图 4 CD147 基因沉默对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响
Fig 4 Effects of silencing the *CD147* gene on the proliferation of MDA-MB-231 cell line



注: A ~ C. DAPI 染色观察细胞对照组、Lv-NC 感染组、Lv-shRNA-CD147 感染组穿过基膜的细胞 ($\times 120$); D. 定量分析 (a. 细胞对照组; b. Lv-NC 感染组; c. Lv-shRNA-CD147 感染组)。^① $P=0.036$, 与 Lv-NC 感染组比较。

图 5 CD147 基因沉默对乳腺癌细胞 T4-2 迁移能力的影响
Fig 5 Effects of silencing the *CD147* gene on the migration of T4-2 cell line



注: a. 细胞对照组; b. Lv-NC 感染组; c. Lv-shRNA-CD147 感染组。^① $P=0.006$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.005$, ^④ $P=0.039$, 与 Lv-NC 感染组比较。

图 6 CD147 沉默对乳腺癌细胞 HCC70 中 β -catenin、MMP2、MMP9 和 Bax 蛋白表达的影响
Fig 6 Effects of silencing the *CD147* gene on protein expressions of β -catenin, MMP2, MMP9, and Bax in HCC70 cell line

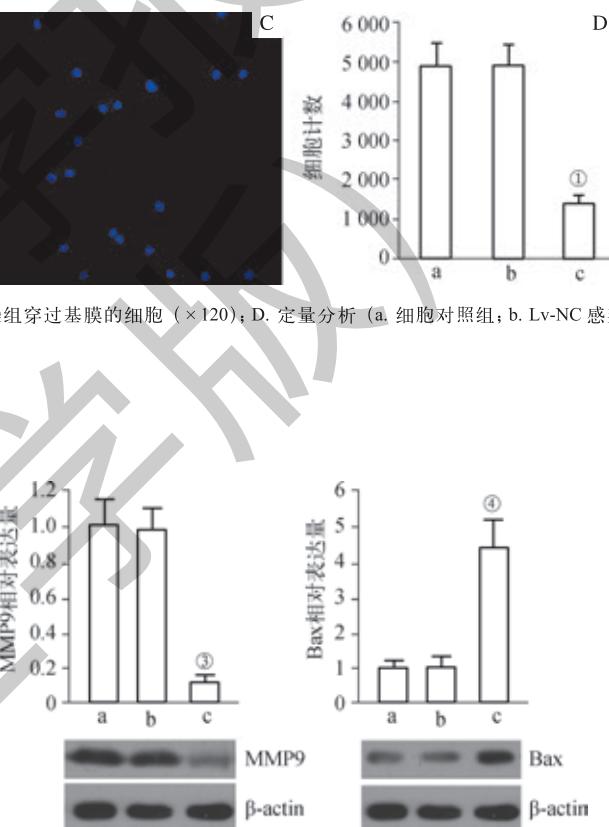
3 讨论

中国乳腺癌占恶性肿瘤总数的 7% ~ 10%，且高发地区主要集中在沿海大城市。在上海地区，乳腺癌发病率已上升至女性恶性肿瘤首位。在国际肿瘤治疗领域，以治疗靶点为基础的肿瘤精准治疗，是解决和降低传统治疗不良

Transwell 试验结果表明，*CD147* 基因沉默能够明显抑制 T4-2 细胞迁移，与细胞对照组或 Lv-NC 愄染组比较，Lv-shRNA-CD147 愄染组穿过基膜的细胞数量明显减少 ($P<0.01$) (图 5)。

2.4 *CD147* 沉默对乳腺癌细胞增殖、迁移、凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示：与细胞对照组和 Lv-NC 愄染组比较，Lv-shRNA-CD147 愄染组 HCC70 细胞中 β -catenin、MMP2、MMP9 蛋白表达明显降低，而 Bax 蛋白表达则明显增强，差异均有统计学意义 ($P<0.01$) (图 6)。



反应的有效途径之一。

根据不同的免疫组织化学特征将乳腺癌进行分子分型：ER、PR 激素受体均阳性的乳腺癌；ER、PR 受体阴性，HER-2 受体阳性的乳腺癌；ER、PR、HER-2 受体均阴性的乳腺癌，即三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC)。每年全世界乳腺癌新增病例约

100万, 其中TNBC患者超过17万, 占乳腺癌患者的10%~17%。TNBC是一种高危乳腺癌, 具有独特的临床特征和生物学行为, 其侵袭性强、局部复发和远处转移率高、化疗敏感性差、总体预后差。目前临幊上TNBC对内分泌治疗及HER-2过表达乳腺癌的靶向治疗不敏感, 辅助治疗只能依靠单纯性化学治疗, 但是仍然存在有效性差、并发症多、耐药性等问题。

CD147又称细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN), 是一种高度糖基化的、广泛表达于造血及非造血细胞系的跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族成员^[5]。人CD147分子曾有多种不同的命名, 包括basigin^[6]、白细胞活化相关M6抗原^[7]、肝癌细胞抗原HAb18G^[8], 与小鼠Bsaing/gp42、大鼠OX47/CE-9、鸡HT7/5A11等不同种属抗原有较高同源性。为此第6届人类白细胞分化抗原协作组会议将来自各实验室不同的命名统一为新的CD, 编号CD147, 分属内皮细胞组^[9]。陈志南等^[10]将CD147分子作为新型肝癌生物标志物首次提出。由于该蛋白清晰的细胞膜定位和在多种肿瘤组织中的高表达, 目前已经成为开发新药的靶点。CD147在体内分布广泛, 包括上皮细胞、内皮细胞、视网膜色素上皮、活化的T细胞、左心室的心肌细胞、毛囊外根鞘细胞、大脑和小脑的神经元等^[11-13]。但CD147在正常及良性病变组织中常呈低表达, 只有在一些癌前病变组织、癌组织中表达明显增高, 且多为过量表达。人们最感兴趣的还是它在肿瘤的生长、浸润和转移中的作用。在恶性肿瘤中, CD147表达常较高, 其在肿瘤的浸润与转移、肿瘤的恶性转化及血管形成中发挥重要作用。目前已在肺癌细胞、卵巢癌细胞、肝癌细胞、脑胶质瘤细胞、口腔鳞状上皮癌细胞及骨肉瘤细胞中克隆出CD147基因。在部分肿瘤中还发现随着肿瘤恶性程度的增高, CD147的表达也增高, 且与肿瘤的浸润和转移相关。大量研究表明, CD147与其效应细胞(肿瘤周围成纤维细胞等)结合, 可诱导产生MMP, 使肿瘤组织中MMP的含量及活性显著提高, 间质成分和血管基膜的胶原蛋白过度降解, 癌细胞便可穿过基膜及结缔组织屏障不断侵袭、扩散, 与肿瘤的发生、转移和预后密切相关^[14]。

近期乳腺癌与CD147的相关研究表明: CD147在乳腺癌组织中呈现高表达, 主要表达于肿瘤细胞的胞膜和胞质, 癌周间质中几乎不表达。通过检测CD147mRNA

水平, 发现乳腺癌组织中CD147mRNA的表达较正常组织和癌旁组织显著升高。随着乳腺癌的进展, CD147的表达不断升高, 其与乳腺癌TNM分期、淋巴结转移、人类表皮生长因子受体2(C-erbB-2)过表达均呈显著正相关, 与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)表达呈负相关; 在不同分型的浸润性乳腺癌中, CD147的表达也具有显著性差异, 与其临床侵袭能力相对应^[15]。CD147是乳腺癌复发、转移的风险因子, CD147蛋白阳性患者无复发生存时间显著低于阴性患者, 且其表达越高患者生存期越短^[16]。在乳腺癌患者中, 伴有远处转移病例CD147蛋白表达明显升高。在细胞系中, 具有转移能力的细胞其CD147分子的表达要高于不具有转移能力的细胞^[17]。MiR-22/Spl/c-Myc调控回路通过上调CD147进而促进乳腺癌细胞的侵袭和转移^[18]。对乳腺癌细胞株MDA-MB-435转染CD147siRNA真核表达载体, 通过CD147siRNA沉默CD147基因的表达后, 可显著下调肿瘤细胞中VEGF、缺氧诱导因子1α、MMP-2 mRNA的表达, 而细胞的凋亡率显著增高^[19]。这些已有的研究表明, CD147在乳腺癌的发生及发展中有着重要且关键的作用, 但现有研究并未对CD147基因在TNBC中的作用及功能进行系统研究。

在本研究中, 我们首先选取3株TNBC细胞, 以正常乳腺上皮细胞作为对照, 对4株细胞中的CD147基因转录及蛋白表达做了比对分析; 结果显示无论转录水平还是蛋白表达, CD147在3株肿瘤细胞中的表达均明显高于正常乳腺上皮细胞。那么在TNBC细胞中靶向沉默CD147是否会对细胞的生物学行为产生影响呢? 为此, 研究通过慢病毒实验途径在3株细胞中针对CD147基因进行了靶向沉默, 检测数据表明针对CD147设计的siRNA序列非常有效。在CD147基因高效沉默的基础上, 研究分别对3株肿瘤细胞的增殖活性, 迁移能力进行了检测分析, 结果表明CD147基因沉默能够明显抑制细胞增殖活性和迁移能力。研究认为, 对TNBC细胞, CD147是一个颇具潜力的基因治疗靶点。此外, 本实验还对CD147抑制TNBC细胞肿瘤活性的机制进行了初步分析, 推测CD147可能通过上调MMP2、MMP9和β-catenin表达而增强细胞增殖活性, 同时通过抑制Bax表达来抑制细胞凋亡。当然, 肿瘤细胞的调控是复杂的, 在未来的研究中, 我们还需要更为深入地研究CD147调控TNBC的作用机制, 为寻找TNBC治疗的新靶标提供更为可靠的理论依据。



参·考·文·献

- [1] Xiong L, Ding L, Ning H, et al. CD147 knockdown improves the antitumor efficacy of trastuzumab in HER2-positive breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(36): 57737-57751.
- [2] Nagashima S, Sakurai K, Suzuki S, et al. CD147 expression in non-invasive and invasive breast carcinoma[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2014, 41(10): 1267-1269.
- [3] Lescaillie G, Menashi S, Cavelier-Balloy B, et al. EMMPRIN/CD147 up-regulates urokinase-type plasminogen activator: implications in oral tumor progression[J]. BMC Cancer, 2012, 12(115): 1471-1480.
- [4] Kong LM, Liao CG, Zhang Y, et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis[J]. Cancer Res, 2014, 74(14): 3764-3778.
- [5] Biswas C, Zhang Y, Decastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (Renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin[J]. Cancer Res, 1995, 55(2): 434-439.
- [6] Miyuchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen[J]. J Biochem, 1991, 110(5): 770-774.
- [7] Kasinrerk W, Fiebiger E, Stefanova I, et al. Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken H17 molecule[J]. J Immunol, 1992, 149(3): 847-854.
- [8] Jiang JL, Zhou Q, Yu MK, et al. The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(50): 46870-46875.
- [9] 金伯泉. 白细胞分化抗原细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001: 427.
- [10] 王贤辉, 陈志南, 郭晓楠. CD147 分子与 MMPs 在肝癌细胞系中表达的相关性[J]. 医学争鸣, 2001, 22(3): 217-219.
- [11] 王祥军, 吴新勇, 何长青, 等. CD147 和 MMP-9 在乳腺癌中的表达及其与微血管生成的相关性研究[J]. 现代肿瘤学杂志, 2010, 18(7): 1318-1321.
- [12] Gras GD, Toole BP. How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity[J]. Biosci Rep, 2015, 36(1): e00283.
- [13] Rucci N, Millimaqqi D, Mari M, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer /CD147[J]. Cancer Res, 2010, 70(15): 6150-6160.
- [14] Bovenzi CD, Hamilton J, Tassone P, et al. Prognostic indications of elevated MCT4 and CD147 across cancer types: a meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 242437.
- [15] Liu F, Cui L, Zhang Y, et al. Expression of HAb18G is associated with tumor progression and prognosis of breast carcinoma[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 124(3): 677-688.
- [16] 争鸣, 张欣, 郭慧芒, 等. CD147 介导 CD4⁺ 肿瘤浸润淋巴细胞促进乳腺癌进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(7): 961-964.
- [17] Qu X, Yang W, Jiang M, et al. CD147 expression in pituitary adenomas and its significance for clinical outcome[J]. Hum Pathol, 2010, 41(8): 1165-1171.
- [18] Kong LM, Liao CG, Zhang Y, et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis[J]. Cancer Res, 2014, 74(14): 3764-3778.
- [19] 张聚良, 姚青, 陈江浩, 等. CD147 siRNA 对乳腺癌细胞 HIF-1 α 、MMP-2 与 VEGF 表达及细胞凋亡的影响[J]. 现代肿瘤学, 2013, 21(2): 247-249.

[收稿日期] 2016-11-03

[本文编辑] 王淑平

学术快讯

上海交通大学医学院附属瑞金医院召开第一届上海市
中西医结合学会微创骨科专业委员会成立大会

2017 年 3 月, 第一届上海市中西医结合学会微创骨科专业委员会成立大会在上海交通大学医学院附属瑞金医院召开。来自全市各医院系统的微创骨科专家共 120 余人参会。会议选举并产生了第一届专业委员会, 上海交通大学医学院附属瑞金医院骨科副主任、脊柱外科主任梁裕教授当选微创骨科专委会首任主任委员。

上海交通大学医学院附属瑞金医院伤科与骨科是全国较早开展中西医结合治疗的单位之一, 中西医结合已成为专业特色之一。自骨科奠基人叶衍庆教授和魏氏伤科创始人魏指薪教授于 1958 年建立我国第一个伤科研究所——上海市伤科研究所以来, 学科取得了巨大的进展。近几年, 瑞金医院在骨伤科疾病的微创治疗和微创手术方面, 积累了较多的临床经验。未来在微创骨科专业委员会平台上, 将进一步推动中医和西医两种医学体系的结合。

