

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001845

PSME3-NF- κ B 途径介导三阴性乳腺癌的侵袭与转移

廖雪莲, 曾 育, 王小毅

(重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科、生物治疗国家重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究蛋白酶体活化复合物 3(proteasome activator complex subunit 3, PSME3)对三阴性乳腺癌侵袭及转移的影响及其机制。**方法:**收集临床三阴性乳腺癌患者标本, 免疫组织化学检测 PSME3 蛋白的表达; 以三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为对象, 利用慢病毒包装系统构建 PSME3 过表达及干扰稳定株。Real-time PCR 法检测 PSME3 的 mRNA 表达, Western blot 检测 PSME3 的蛋白表达。实验分为 PSME3 过表达(expression of PSME3, exPSME3)组、PSME3 干扰(short hairpin RNA targeting PSME3, shPSME3)组和野生型对照组。在以 Western blot 法进行稳定株鉴定时, 为排除载体本身对 PSME3 表达的影响, 特增加 PSME3 过表达阴性对照(expression negative control, exNC)组、PSME3 干扰阴性对照(short hairpin RNA targeting negative control, shNC)组。划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, Western blot 进一步检测迁移相关蛋白血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在各组的表达情况。细胞爬片免疫荧光与 Western blot 分别检测核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)及其活性基团, 磷酸化的 P65 蛋白(phosphorylated-P65, P-P65)的表达。**结果:**免疫组织化学结果显示 PSME3 在三阴性乳腺癌患者肿瘤组织表达明显高于癌旁组织($t=36.700, P=0.000$)。划痕实验结果显示 exPSME3 组的迁移能力高于对照组($P=0.000$), shPSME3 组的迁移能力低于对照组($P=0.009$)。迁移相关蛋白检测示 VEGF-A、MMP9 均在 exPSME3 组高表达, 在 shPSME3 组低表达, 与对照组相比有统计学差异。Transwell 实验结果显示 exPSME3 组的侵袭能力高于对照组($P=0.000$), shPSME3 组的侵袭能力低于对照组($P=0.000$)。细胞爬片免疫荧光结果提示各组间 NF- κ B 蛋白表达无明显差异, 而 exPSME3 组 P-P65 表达明显高于对照组($P=0.001$), shPSME3 组 P-P65 表达低于对照组($P=0.001$), Western blot 检测结果与之一致。**结论:**PSME3-NF- κ B 途径可介导三阴性乳腺癌的侵袭及转移。

【关键词】三阴性乳腺癌; 蛋白酶体活化复合物 3; 核因子- κ B; 侵袭; 转移

【中图分类号】R736.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-15

Invasion and metastasis of triple-negative breast cancer mediated by the PSME3-NF- κ B pathway

Liao Xuelian, Zeng Yu, Wang Xiaoyi

(Department of Endocrine and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; State Key Laboratory of Biotherapy)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of proteasome activator complex subunit 3 (PSME3) on the invasion and metastasis of triple-negative breast cancer (TNBC) and its mechanism. **Methods:** The samples collected from TNBC patients were used to detect the expression of PSME3 by immunohistochemistry. The TNBC cell line MDA-MB-231 was used to construct PSME3 overexpression and interference stable strains using the lentiviral packaging system. The mRNA expression of PSME3 was determined by real-time PCR and the protein expression of PSME3 was measured by Western blot. The cell lines were divided into PSME3 overexpression (exPSME3) group, short hairpin RNA targeting PSME3 (shPSME3) group, and wild-type control group. When Western blot was used to identify stable strains, PSME3 expression negative control (exNC) group and short hairpin RNA targeting negative control (shNC) group were included in order to exclude the effect of the vector itself on PSME3 expression. The cell migration ability and invasion ability were evaluated by wound healing assay and Transwell assay, respectively. The expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (migration-related proteins) in each group was measured by Western blot. The protein expression of nuclear factor-

作者介绍:廖雪莲, Email: liaoxuelianbest@163.com,

研究方向: 乳腺癌侵袭转移机制。

通信作者:王小毅, Email: wxytsf@sina.com。

基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会资助项目(编号: 2015HBR003)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180929.1044.008.html>
(2018-09-30)

κB (NF- κB) and its active group — phosphorylated-P65 (P-P65) was determined by cell slide immunofluorescence and Western blot, respectively. **Results:** Immunohistochemical results showed that PSME3 expression was significantly higher in the tumor tissues of TNBC patients than in the adjacent tissues ($t=36.700, P=0.000$). The wound healing assay indicated that compared with the control group, the migration ability was significantly higher in the exPSME3 group ($P=0.000$) and significantly lower in the shPSME3 group ($P=0.009$). Western blot results showed that compared with the control group, the expression of VEGF-A and MMP-9 was significantly higher in the exPSME3 group and significantly lower in the shPSME3 group. Transwell assay revealed that compared with the control group, the invasion ability was significantly higher in the exPSME3 group ($P=0.000$) and significantly lower in the shPSME3 group ($P=0.000$). Cell slide immunofluorescence results showed that there was no significant difference in the expression of NF- κB between the three groups; compared with the control group, the expression of P-P65 was significantly higher in the exPSME3 group ($P=0.001$) and significantly lower in the shPSME3 group ($P=0.001$), which was in accordance with Western blot results. **Conclusion:** The PSME3-NF- κB pathway can mediate the invasion and metastasis of TNBC.

[Key words] triple-negative breast cancer; proteasome activator complex subunit 3; nuclear factor- κB ; invasion; metastasis

三阴性乳腺癌,即雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progestogen receptor, PR)及人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)均阴性的一种特殊类型乳腺癌,约占乳腺癌患者总数的 10%~17%^[1]。目前临床上尚且缺乏针对三阴性乳腺癌的有效治疗方案,其治疗以化疗为主,容易复发转移,预后极差^[2]。

蛋白酶体活化复合物 3(proteasome activator complex subunit 3, PSME3)又称 PA28 γ 、REG γ ,最初在系统性红斑狼疮患者中被发现,被视为自身抗原(Ki 抗原)^[3]。对 PSME3 基因缺陷鼠的研究发现,PSME3 与细胞增殖密切相关^[4]。随着研究不断深入,PSME3 被证实为 11S 蛋白酶体家族的一员,由 α 、 β 、 γ 3 个亚基组成,通过激活 20S 蛋白酶体核心蛋白,以无泛素及无能量依赖的方式降解多种重要蛋白,包括类固醇受体共激活剂-3(Steroid receptor coactivator -3, SRC-3)^[5]、细胞周期调控蛋白 P16^[6]、P21^[7]、P53^[8]以及 c-Myc^[9]等。由于 PSME3 参与细胞周期调控、促进细胞增殖、降低细胞凋亡^[10]等特性,一系列研究着眼于 PSME3 在肿瘤发生发展中的作用。研究表明,PSME3 与乳腺癌^[11]、胰腺癌^[9]、结直肠癌^[12]、前列腺癌^[13]等肿瘤密切相关。但 PSME3 与三阴性乳腺癌的关系及相关机制尚不明确。

核因子- κB (nuclear factor κB , NF- κB)包含 RelA、p65、RelB、cRel 及 p52 五个成员。NF- κB 参与多种肿瘤相关基因的转录调控,与肿瘤增殖^[14]、转移^[15]、p50 凋亡抵抗^[16]等恶性行为密切相关^[17]。在细胞非活化状态, NF- κB 以 P65 形式与其抑制性基团 I κB 结合,存在于细胞质内;而在活化状态, I κB 被降解, NF-

κB 得以进入核内,以磷酸化 P65 (phosphorylated-P65, P-P65)形式发挥转录调控作用。研究表明, NF- κB 与三阴性乳腺癌的恶性行为密切相关^[18],抑制 NF- κB 有望成为三阴性乳腺癌的治疗方式^[19]。

既往研究证实, PSME3 可负反馈调节 NF- κB , 参与固有免疫反应^[20],但其在肿瘤生物学行为中是否对 NF- κB 存在正向调节作用尚未阐明。

本文旨在研究 PSME3 在三阴性乳腺癌中是否高表达, PSME3 水平变化后是否影响乳腺癌细胞恶性生物学行为, PSME3 是否活化转录因子 NF- κB , 从而阐明 PSME3-NF- κB 途径对三阴性乳腺癌的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三阴性乳腺癌组织及对应癌旁组织标本共 5 对,均来自重庆医科大学病理科的临床三阴性乳腺癌患者的石蜡切片。细胞系 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株来自 American Type Culture Collection (Manassas, VA, 美国)。

总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; RNA 逆转录试剂盒和 Real-time PCR 试剂盒购于大连 Takara 公司; 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; PSME3 及 NF- κB 兔单克隆抗体购于上海优宁维生物科技股份有限公司; 血管内皮生长因子-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9) 兔单克隆抗体购于杭州华安生物; ECL 化学发光液购自美国 Millipore 公司; DAB 显色液, BCA 蛋白定量试剂盒及 RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学检测 将所有乳腺癌组织切片采用 SP 法进行免疫组织化学染色,经过烤片、脱蜡、抗原修复后,按照试剂盒说明书步骤进行,DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。PSME3 工作浓度为 1:100。免疫组化半定量分析,采用 Image J 软件检测阳性组织平均吸光度值。

1.2.2 细胞培养 三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 生长于含 10%胎牛血清及 1%青霉素/链霉素的 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培养基,放置于含 5%CO₂ 的 37 ℃ 孵育箱。

1.2.3 基因过表达与沉默 PSME3 基因整合入过表达载体 pCDH(嘌呤霉素抗性)以过表达 PSME3(expression of PSME3, exPSME3),pCDH 空载作为阴性对照(expression negative control, exNC)。靶向 PSME3 的小发夹 RNA 整合入干扰载体 pLKO.1(嘌呤霉素抗性)以干扰 PSME3 表达(short hairpin RNA targeting PSME3, shPSME3),pLKO.1 空载作为阴性对照(short hairpin RNA targeting negative control, shNC)。HEK-293T 用于产生慢病毒,以含 8 μg/mL polybrene 的病毒上清感染 MDA-MB-231 细胞(24 h)。0.5 mg/mL 的嘌呤霉素用于筛选 MDA-MB-231 稳定转染细胞株。

1.2.4 qRT-PCR 按天根总 RNA 提取试剂盒提取纯化 RNA,以 Takara 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。然后以 Sybr Green 作为荧光标记物,在 ABI7300 荧光实时定量 PCR 仪(Roche 公司,德国)上进行 PCR 反应。PCR 引物如下:PSME3 上游:5'-AAGGTTGATTCTTTCAGGGAGC-3';下游:5'-AG-TGGATCTGAGTTAGGTCATGG-3';NF-κB 上游:5'-ATGC-CCAAGGAGTTGAAATTGT-3';下游 5'-ACACCAAAGTCCC-ATGTCTTTTT-3'。反应条件如下:预变性(95 ℃ 10 s);PCR 反应(40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 31 s)。使用 2^{-ΔC_T} 法计算相对 mRNA 含量,ΔC_T=C_T(目的基因)-C_T(管家基因 GAPDH),ΔΔC_T=ΔC_T(实验组)-ΔC_T(对照组),2^{-ΔΔC_T} 表示实验组目的基因 mRNA 的含量相对对照组所改变的倍数。每组设置 3 个副孔,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 细胞样品以 RIPA 裂解液冰上裂解后提取各细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度并进行相对定量,使各样品总蛋白浓度一致。蛋白样品与 5×蛋白上样缓冲液按 4:1 体积混合后 100 ℃加热 10 min 使蛋白变性,在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,完毕后采用湿转法将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,先后加入特异性一抗和相对应的二抗,最后经 ECL 发光显影,采用特异性基因光密度/管家基因光密度(β-Tubulin)相对定量。Photoshop 整理去色,Alpha 软件处理系统分析目标带的光密度值。单次实验每组样本量为 1,实验共重复 3 次。

1.2.6 划痕实验 将细胞以胰酶消化,完全培养基重悬后,于 6 孔板内铺板,取 4 × 10⁵ 个细胞/孔。待细胞密度达 100% 时,以中号枪尖划痕,显微镜下观察,取间距相似的视野拍

照,并做好标记。24 h 后于标记的位置重复镜下拍照。细胞迁移率=(细胞迁移前面积-细胞迁移后面积)/细胞迁移前面积。ImageJ 测量划痕面积。每组样本量为 3,实验共重复 3 次。

1.2.7 Transwell 实验 将细胞饥饿(无血清培养基)培养 24 h 后,胰酶消化,以 DMEM(-/-)培养基重悬,计数,取 7.5 × 10⁴ 个细胞/孔,补培养基至 200 μL,加入到 Transwell 小室(康宁公司,美国)内。小室下层加入 700 μL DMEM(+/-)培养基。24 h 后,取出小室,4%多聚甲醛固定 30 min,风干,结晶紫染色 20 min,以棉签拭去小室内层未迁移细胞,双蒸水洗 3 遍。镜下观察,取多个视野摄像,计数,取均值。每组样本量为 3,实验共重复 3 次。

1.2.8 细胞爬片免疫荧光 将无菌爬片放入 24 孔板中,细胞以胰酶消化后计数,取 5000 个细胞每孔,铺板。24 h 后,以 PBS 洗 3 遍,4%多聚甲醛固定 20 min,以 0.1%Triton 100 室温作用 20 min 打孔,山羊血清封闭 30 min,孵育特异性一抗和相对应的二抗。NF-κB 及 P-P65 工作浓度为 1:25。DAPI 复染核,以抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下摄像。以 Image-pro plus 6.0 分析平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)。每组样本量为 3,实验共重复 3 次。

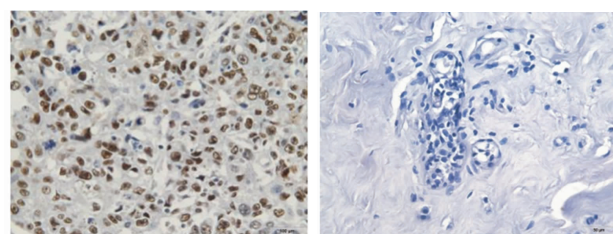
1.3 统计学处理

所有资料采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理,所得数值以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两独立样本比较采用 *t* 检验;多样本均数比较用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测

三阴性乳腺癌组织中 PSME3 表达量较高,呈棕黄色颗粒,着色较深,主要阳性表达部位在乳腺癌组织胞质内。而乳腺癌旁组织几乎不表达 PSME3,胞内无明确可见的黄染区;在 5 对样本中,三阴性乳腺癌组与非三阴性乳腺癌组的平均吸光度值分别为 121.700 ± 2.172、30.220 ± 1.222。两独立样本 *t* 检验示三阴性乳腺癌组织中 PSME3 的表达量明显高于非三阴性乳腺癌组织(*t*=36.700, *P*=0.000)。如图 1 所示。



A. 乳腺癌组织

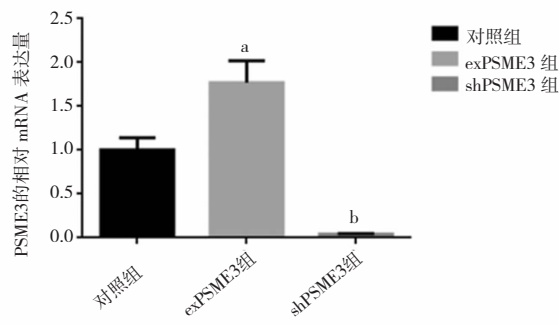
B. 癌旁组织

图 1 免疫组织化学法检 PSME3 在三阴性乳腺癌组织及癌旁组织中的表达(200 ×)

2.2 Real-time PCR 检测结果

以 2^{-ΔC_T} 比较 PSME3 mRNA 水平定量检测结果,以 MDA-

MB-231 野生型细胞的 mRNA 水平为对照(即 100%),结果显示,对照组、exPSME3 组及 shPSME3 组细胞内 mRNA 表达量分别为 1.003 ± 0.138 、 1.770 ± 0.249 、 0.042 ± 0.007 。方差分析示 3 组 PSME3 表达水平具有统计学差异($F=83.350$, $P=0.000$)。两两比较结果显示 exPSME3 组 PSME3 的 mRNA 表达量较对照组明显增加($P=0.002$), shPSME3 组 PSME3 的 mRNA 表达量较对照组明显降低($P=0.001$)。如图 2 所示。



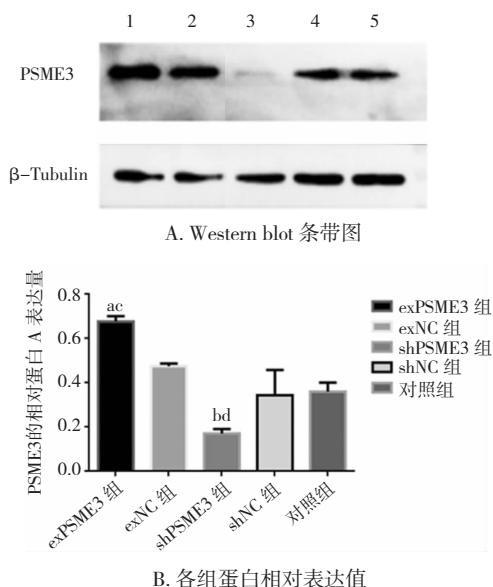
a: 与对照组比较, $P=0.002$; b: 与对照组比较, $P=0.001$

图 2 Real-time PCR 检测 PSME3 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 Western blot 检测结果

Western blot 结果显示:以蛋白 Marker 为参照,各组均在 28 kD 处显示条带,说明各组均有 PSME3 的表达。 β -Tubulin 表达位于 52 kD 处,以 β -Tubulin 为内参,采用 AlphaEase FC 软件定量分析各组 PSME3 的蛋白表达水平。exPSME3 组、exNC 组、shPSME3 组、shNC 组、对照组分别为 0.677 ± 0.025 、 0.475 ± 0.013 、 0.171 ± 0.020 、 0.345 ± 0.114 、 0.360 ± 0.041 。单因素方差分析示各组间 PSME3 表达有差异($F=32.950$, $P=0.000$)。两两比较显示,exPSME3 组 PSME3 的蛋白表达高于对照组($P=0.000$)及 exNC 组($P=0.009$), shPSME3 组 PSME3 的蛋白表达低于对照组($P=0.014$)及 shNC 组($P=0.024$);对

照组与 exNC 组($P=0.169$)、shNC 组($P=0.997$)之间无明显差异(图 3)。



B. 各组蛋白相对表达值

1:exPSME3 组;2:exNC 组;3:shPSME3 组;4:shNC 组;5:对照组

a: 与对照组比较, $P=0.000$; b: 与对照组比较, $P=0.014$; c: 与 exNC 组比较, $P=0.009$; d: 与 shNC 组比较, $P=0.024$

图 3 Western blot 检测各组细胞 PSME3 表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 划痕实验结果

划痕实验结果示:以细胞迁移率为衡量标准,exPSME3 组细胞迁移率为 $(72.4 \pm 6.3)\%$, shPSME3 组细胞迁移率为 $(17.6 \pm 6.3)\%$, 对照组细胞迁移率为 $(32.8 \pm 3.7)\%$ 。方差分析示 3 组间细胞迁移率具有统计学差异($F=104.400$, $P=0.000$)。两两比较显示,exPSME3 组细胞迁移率高于对照组($P=0.000$), shPSME3 组迁移率明显低于对照组($P=0.009$)。如图 4、表 1 所示。

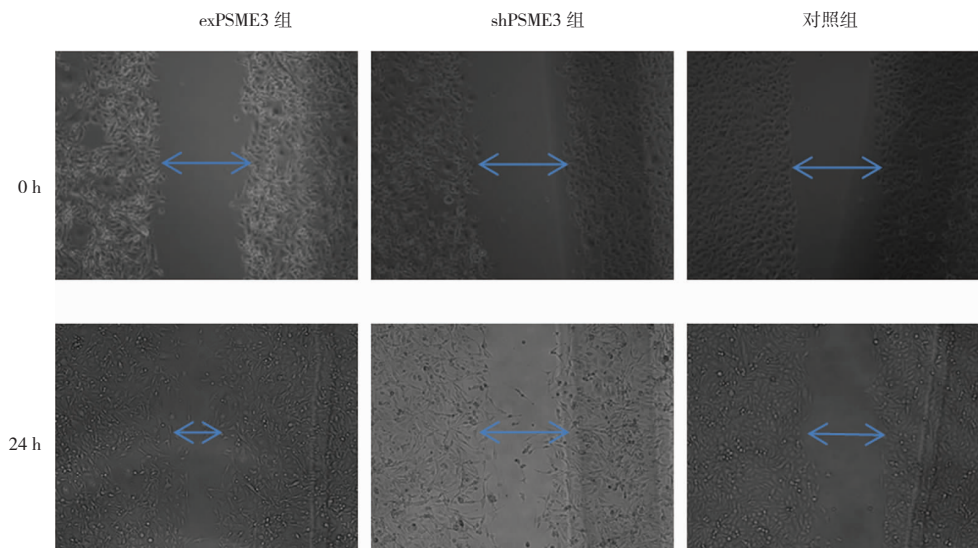


图 4 划痕实验检测各组细胞迁移能力 ($200 \times$)

表 1 各组细胞迁移及侵袭能力 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	划痕实验 (%)	Transwell实验
exPSME3组	72.4 ± 6.3 ^a	1457.000 ± 103.200 ^e
shPSME3组	17.6 ± 6.3 ^b	439.400 ± 65.290 ^c
对照组	32.8 ± 3.7	754.000 ± 100.600
F 值	104.400	162.600
P 值	0.000	0.000

注:a,划痕实验中,与对照组比较, $P=0.000$;b:划痕实验中,与对照组比较, $P=0.009$;c:Transwell 实验中,与对照组比较, $P=0.000$

2.5 Transwell 实验结果

Transwell 实验结果示:以细胞迁移个数为衡量标准,多角度拍摄后计数迁移的细胞个数,exPSME3 组细胞迁移个数为 1457.000 ± 103.200 ,shPSME3 组细胞迁移个数为 439.400 ± 65.290 ,对照组细胞迁移个数为 754.000 ± 100.600 。方差分析示 3 组细胞迁移个数的差异有统计学意义 ($F=162.600, P=0.000$)。两两比较显示,exPSME3 组细胞迁移个数高于对照组 ($P=0.000$),shPSME3 组迁移个数低于对照组 ($P=0.000$),有统计学差异。如图 5、表 1 所示。

2.6 Western blot 检测迁移相关蛋白 VEGF-A、MMP-9 的表达量

Western blot 实验结果示:以蛋白 Marker 为参照,VEGF-A 在 27 kD 处显示条带,MMP-9 在 78 kD 处显示条带。GAPDH 表达位于 33 kD 处,以 GAPDH 为内参,采用 AlphaEase FC 软件定量分析各组 VEGF-A、MMP-9 的蛋白表

达水平。图 6 所示:VEGF-A 灰度值在 exPSME3 组、shPSME3 组、对照组分别为 $0.996 \pm 0.021, 0.079 \pm 0.012, 0.432 \pm 0.027$ 。方差分析示 3 组之间差异明显 ($F=512.600, P=0.000$)。两两比较,exPSME3 组 VEGF-A 表达水平高于对照组 ($P=0.000$),shPSME3 组低于对照组 ($P=0.000$)。MMP-9 灰度值在 exPSME3 组、shPSME3 组、对照组分别为 $0.603 \pm 0.034, 0.040 \pm 0.002, 0.280 \pm 0.022$ 。方差分析示 3 组间 MMP-9 表达水平具有统计学差异 ($F=141.500, P=0.000$)。exPSME3 组 MMP-9 表达水平高于对照组 ($P=0.000$),shPSME3 组低于对照组 ($P=0.001$)。见图 6。

2.7 细胞爬片免疫荧光实验结果检测各组间 P65 表达量

克隆形成实验结果示:以 MFI 为衡量标准,通过 Image-pro plus 6.0(Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA)软件计算 MFI 值。exPSME3 组 P65 的 MFI 为 208.100 ± 1.337 ,shPSME3 组为 202.200 ± 11.590 ,对照组为 206.700 ± 1.322 ,3 组之间无统计学差异 ($F=0.202, P=0.820$)。如图 7、表 2 所示。

2.8 细胞爬片免疫荧光实验检测各组间 P-P65 表达量

克隆形成实验结果示:以 MFI 为衡量标准,通过 Image-pro plus 6.0 软件计算 MFI。exPSME3 组 P-P65 的 MFI 为 209.000 ± 1.202 ,shPSME3 组为 74.430 ± 16.890 ,对照组为 136.600 ± 16.480 。方差分析示 3 组间 P-P65 表达水平具有统计学差异 ($F=56.410, P=0.000$)。exPSME3 组 P-P65 表达水平高于对照组 ($P=0.001$),shPSME3 组低于对照组 ($P=0.001$),具有统计学差异。如图 8、表 2 所示。

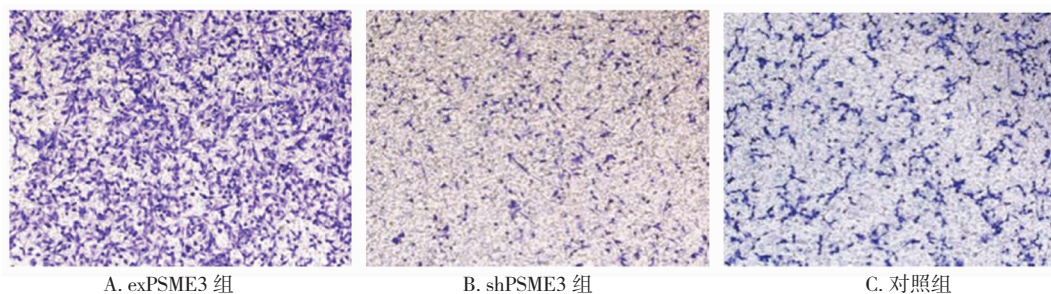


图 5 Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力 (200 ×)

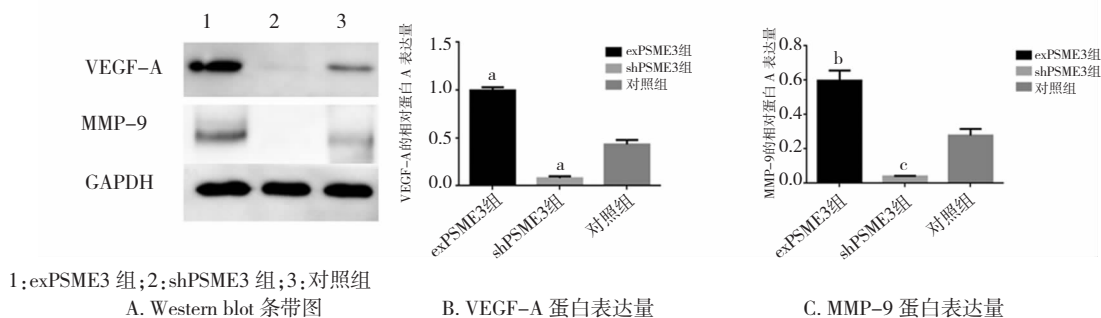
图 6 Western blot 检测各组 VEGF-A、MMP-9 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 细胞爬片免疫荧光检测各组 P65 及 P-P65 的蛋白水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	P65 MFI	P-P65 MFI
exPSME3组	208.100 ± 1.337	209.000 ± 1.202 ^a
shPSME3组	202.200 ± 11.590	74.430 ± 16.890 ^a
对照组	206.700 ± 1.322	136.600 ± 16.480
<i>F</i> 值	0.202	56.410
<i>P</i> 值	0.820	0.000

注:a,与对照组比较, $P=0.001$

2.9 Western blot 进一步检测 P65、P-P65 的表达量

Western blot 实验结果示:以蛋白 Marker 为参照,各组 P65 在 65 kD 处显示条带,P-P65 在 60 kD 处显示条带,说明各组均有 P65、P-P65 的表达。GAPDH 表达位于 33 kD 处,以 GAPDH 为内参,采用 AlphaEase FC 软件定量分析各组 P65 及 P-P65 的蛋白表达水平。图 7 所示:P65 灰度值在 exPSME3 组、shPSME3 组、对照组分别为 0.947 ± 0.127 、 0.937 ± 0.046 、 0.957 ± 0.052 。方差分析示 3 组之间无明显差异($F=0.016$, $P=0.984$)。而 P-P65 灰度值在 exPSME3 组、shPSME3 组、对照

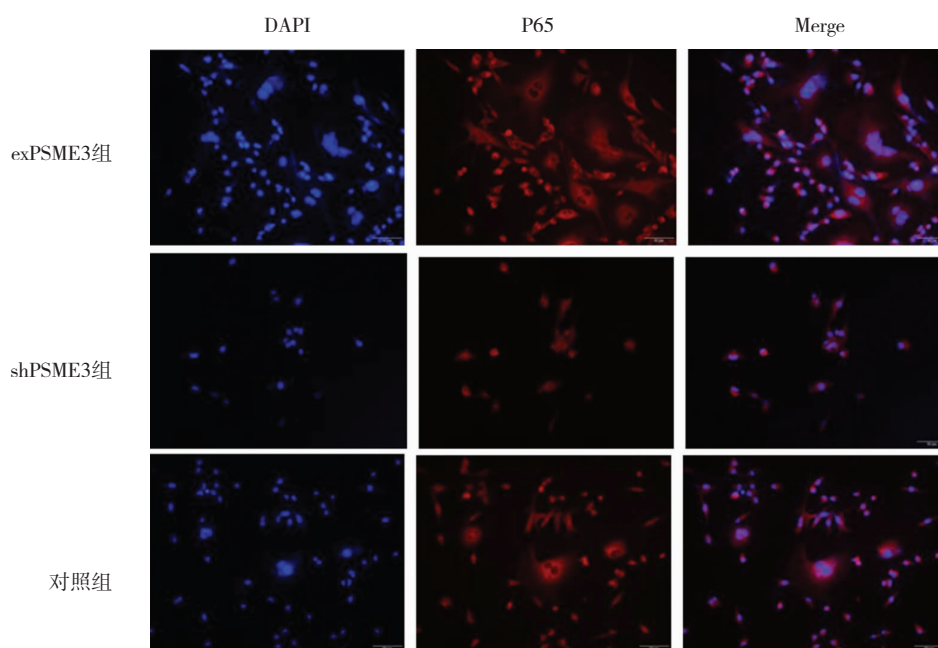


图 7 细胞爬片免疫荧光实验检测各组 NF-κB 的蛋白表达 (200 ×)

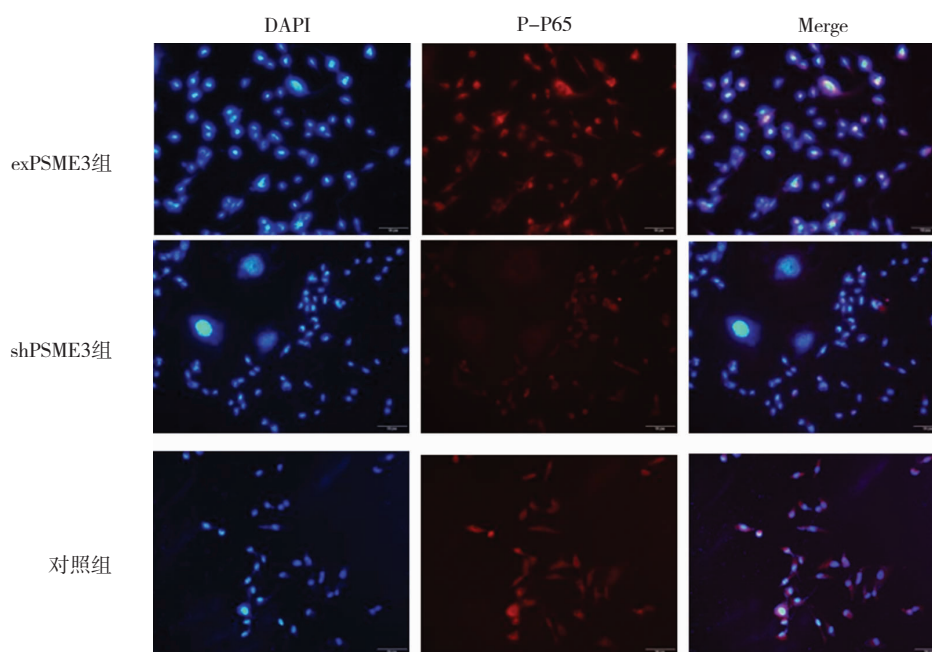
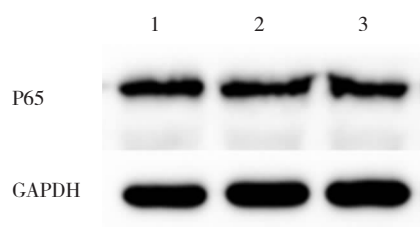
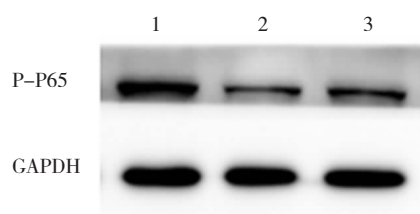


图 8 细胞爬片免疫荧光实验检测各组 P-P65 的蛋白表达 (200 ×)

组分别为 0.897 ± 0.047 、 0.337 ± 0.029 、 0.576 ± 0.037 。方差分析示 3 组间 P-P65 表达水平具有统计学差异 ($F=54.320$, $P=0.000$)。exPSME3 组 P-P65 表达水平高于对照组 ($P=0.002$)，shPSME3 组低于对照组 ($P=0.011$)，具有统计学差异。如图 9、表 3 所示。



A. P65 蛋白表达 Western blot 条带图



B. P-P65 蛋白表达 Western blot 条带图

1: exPSME3 组; 2: shPSME3 组; 3: 对照组

图 9 Western blot 检测各组 P65、P-P65 的蛋白表达

表 3 Western blot 检测各组 P65 及 P-P65 的蛋白水平
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	P65 蛋白相对表达量	P-P65 蛋白相对表达量
exPSME3 组	0.947 ± 0.127	0.897 ± 0.047^a
shPSME3 组	0.937 ± 0.046	0.337 ± 0.029^b
对照组	0.957 ± 0.052	0.576 ± 0.037
F 值	0.016	54.320
P 值	0.984	0.000

注: a, 与对照组比较, $P=0.002$; b, 与对照组比较, $P=0.011$

3 讨论

三阴性乳腺癌由于治疗手段匮乏, 肿瘤自身恶性程度高, 极易复发转移, 目前临床上尚无有效的治疗手段。因此, 深入了解三阴性乳腺癌发生机制, 寻找新的治疗靶点迫在眉睫。

PSME3 在多种癌组织中高表达, 参与多种细胞周期蛋白的非泛素化降解, 因而被视为致癌基因。PSME3 在肿瘤的发生发展中, 参与肿瘤转移、凋亡抵抗等多种恶性生物学行为。研究表明, 乳腺癌组

织中 PSME3 水平的高低与患者的预后密切相关, 高表达 PSME3 的患者通常预后不良^[11]。此外, PSME3 高表达促进乳腺癌侵袭、迁移等恶性生物学行为^[21], 但 PSME3 在三阴性乳腺癌患者组织中的表达情况及其对三阴性乳腺癌恶性生物学行为的影响尚无定论。本研究着重检测了 PSME3 在三阴性乳腺癌患者肿瘤组织中的表达, 发现三阴性乳腺癌组织中 PSME3 表达远高于癌旁组织。体外实验进一步证实, 在三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的研究中, 发现过表达 PSME3 可促进肿瘤细胞转移及侵袭等恶性生物学行为。相反, 干扰 PSME3 后可观察到肿瘤细胞转移及侵袭能力的下调。进一步检测迁移相关蛋白显示, exPSME3 组的 VEGF-A、MMP-9 蛋白表达高于对照组, 而 shPSME3 组的 VEGF-A、MMP-9 蛋白表达明显低于对照组, 进一步证实 PSME3 对三阴性乳腺癌的侵袭转移具有促进作用。但 PSME3 对三阴性乳腺癌生物学行为影响的机制尚且未知。

NF- κ B 作为转录因子, 参与多种基因的转录调控。NF- κ B 活化后可上调多种与肿瘤相关基因的表达, 在肿瘤的增殖迁移、凋亡抵抗、免疫逃逸等功能方面均发挥重要作用。研究表明, PSME3 可通过降解 I κ B 促进 NF- κ B 活化, 从而增强其转录调控功能, 参与固有免疫反应^[20], 并且在结肠炎的发生中也对 NF- κ B 起正向调节作用^[22]。但 PSME3 与 NF- κ B 在肿瘤生物学行为方面的相关性尚未阐明。本研究通过细胞爬片免疫荧光检测了过表达及干扰 PSME3 后细胞内 P-P65 蛋白表达, 结果显示: 过表达 PSME3 可提高 P-P65 的表达量; 相反, 当沉默 PSME3 基因后, P-P65 蛋白表达明显下调。为避免免疫荧光检测存在主观误差, 进一步以 Western blot 方法检测各组 P65 及 P-P65 的蛋白水平。与免疫荧光结果一致, 3 组间 P65 表达无明显差异, 而 P-P65 却在 exPSME3 组高表达, shPSME3 组低表达。因此本课题组认为, 在肿瘤恶性生物学行为中, PSME3 与 NF- κ B 同样存在正向调节关系。

综上所述, 本研究通过检测 PSME3 在三阴性乳腺癌中的表达, 对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 分别进行 PSME3 过表达和沉默后验证其迁移、侵袭等恶性生物学行为变化, 同时检测 NF- κ B 的表达

变化得出如下结论:PSME3-NF- κ B 途径可介导三阴性的乳腺癌侵袭及转移。

参 考 文 献

- [1] Wang C, Kar S, Lai X, et al. Triple negative breast cancer in Asia: an insider's view[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 29–38.
- [2] Lee A, Djamgoz MBA. Triple negative breast cancer: emerging therapeutic modalities and novel combination therapies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 110–122.
- [3] Nikaido T, Shimada K, Shibata M, et al. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 1990, 79(2): 209–214.
- [4] Murata S, Kawahara H, Tohma S, et al. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(53): 38211–38215.
- [5] Li X, Lonard DM, Jung SY, et al. The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REG gamma proteasome[J]. *Cell*, 2006, 124(2): 381–392.
- [6] Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, et al. ARF regulates the stability of p16 protein via REGgamma-dependent proteasome degradation[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(8): 828–833.
- [7] Li X, Amazit L, Long W, et al. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway[J]. *Mol Cell*, 2007, 26(6): 831–842.
- [8] Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation[J]. *EMBO J*, 2008, 27(6): 852–864.
- [9] Guo J, Hao J, Jiang H, et al. Proteasome activator subunit 3 promotes pancreatic cancer growth via c-Myc-glycolysis signaling axis[J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 161–167.
- [10] Barton LF, Runnels HA, Schell TD, et al. Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2004, 172(6): 3948–3954.
- [11] Chai F, Liang Y, Bi J, et al. High expression of REGgamma is associated with metastasis and poor prognosis of patients with breast cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7834–7843.
- [12] Roessler M, Rollinger W, Mantovani-Endl L, et al. Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(11): 2092–2101.
- [13] Chen S, Wang L, Xu C, et al. Knockdown of REGg inhibits proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(8): 3787–3795.
- [14] Zhang K, Mu L, Ding MC, et al. NF- κ B mediated elevation of KC-NJ11 promotes tumor progression of hepatocellular carcinoma through interaction of lactate dehydrogenase A[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 246–253.
- [15] Pan PJ, Tsai JJ, Liu YC. Amentoflavone inhibits metastatic potential through suppression of ERK/NF- κ B activation in osteosarcoma U2OS cells[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9): 4911–4918.
- [16] Wu YH, Huang YF, Chang TH, et al. Activation of TWIST1 by COL11A1 promotes chemoresistance and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by modulating NF- κ B-mediated IKKbeta expression[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(11): 2305–2317.
- [17] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer[J]. *Nature*, 2004, 431(7007): 461–466.
- [18] Singel SM, Batten K, Cornelius C, et al. Receptor-interacting protein kinase 2 promotes triple-negative breast cancer cell migration and invasion via activation of nuclear factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase pathways[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(2): R28.
- [19] Poma P, Labbozzetta M, D'Alessandro N, et al. NF- κ B is a potential molecular drug target in triple-negative breast cancers[J]. *Omics*, 2017, 21(4): 225–231.
- [20] Sun J, Luan Y, Xiang D, et al. The 11S proteasome subunit PSME3 is a positive feedforward regulator of NF- κ B and important for host defense against bacterial pathogens[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(4): 737–749.
- [21] Chai F, Liang Y, Bi J, et al. REG gamma regulates ER alpha degradation via ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 534–540.
- [22] Xu J, Zhou L, Ji L, et al. The REG γ -proteasome forms a regulatory circuit with I κ B ϵ and NF- κ B in experimental colitis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10761.

(责任编辑:冉明会)