



· 论 著 ·

TRIP6在乳腺癌中的作用及其机制研究

王春建¹, 聂刚², 毛艳²

1. 山东省肿瘤医院乳腺科, 山东 济南 250000;
2. 青岛大学附属医院乳腺病诊疗中心, 山东 青岛 266555

[摘要] 背景与目的: 甲状腺激素及其受体与乳腺癌关系密切, 甲状腺激素受体相互作用蛋白6 (thyroid receptor-interacting protein 6, TRIP6) 可能通过与甲状腺受体相互作用促进乳腺癌的发生、发展。探讨TRIP6在乳腺癌中的作用及可能机制。方法: 采用免疫组织化学染色法检测2011年1月—2013年12月山东省肿瘤医院手术切除的268例乳腺癌组织及其配对的癌旁组织、80例乳腺良性纤维腺瘤组织中TRIP6和转录因子叉头框蛋白C1 (forkhead box C1, FOXC1) 的表达。用COX比例风险回归模型和Kaplan-Meier法分析乳腺癌患者的生存预后。采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测正常乳腺上皮细胞MCF-10A和乳腺癌细胞 (BT474、MCF7和MDA-MB-231) 中TRIP6和FOXC1的表达。用TRIP6 si-RNA和si-control分别转染MDA-MB-231细胞, 采用克隆形成实验和细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验检测细胞增殖, 采用transwell小室实验检测细胞侵袭, 采用细胞划痕实验检测细胞迁移, 采用Western blot检测FOXC1蛋白的相对表达量。结果: 乳腺癌组织中TRIP6和FOXC1的阳性表达率分别为85.08%和88.06%, 均高于乳腺良性纤维腺瘤组织 (25.00%和15.00%) 和乳腺癌癌旁组织 (55.97%和62.31%) (P 均 <0.01)。乳腺癌组织TRIP6与FOXC1的阳性表达率呈正相关 ($r=0.771$, $P<0.001$)。TRIP6高表达和FOXC1高表达是乳腺癌患者总生存期和无进展生存期的独立影响因素 (P 均 <0.05)。TRIP6高表达乳腺癌患者的总生存率和无进展生存率均低于TRIP6低表达患者 (P 均 <0.001); FOXC1高表达乳腺癌患者的总生存率和无进展生存率均低于FOXC1低表达患者 (P 均 <0.001)。BT474、MCF7和MDA-MB-231细胞的TRIP6和FOXC1蛋白相对表达量均高于MCF-10A细胞 (P 均 <0.05)。MDA-MB-231细胞中TRIP6和FOXC1蛋白相对表达量呈正相关 ($r=0.908$, $P=0.033$)。TRIP6 si-RNA组克隆细胞数、增殖活力、细胞侵袭数、细胞迁移率和FOXC1蛋白相对表达量均低于si-control组 (P 均 <0.05)。结论: TRIP6可能通过FOXC1参与乳腺癌的发生、发展过程, 其高表达预示着患者预后不良。

[关键词] 甲状腺激素受体相互作用蛋白6; 叉头框蛋白C1; 乳腺癌; 增殖; 侵袭; 迁移; 预后

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.03.001

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)03-0161-09

The role of TRIP6 in breast cancer and its mechanism WANG Chunjian¹, NIE Gang², MAO Yan² (1. Department of Breast, Shandong Cancer Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China; 2. Breast Center, Qingdao University Affiliated Hospital, Qingdao 266555, Shandong Province, China)

Correspondence to: NIE Gang E-mail: yuzhimu37552434@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Thyroid hormone and its receptors are closely related to breast cancer. Thyroid receptor-interacting protein 6 (TRIP6) may promote the occurrence and development of breast cancer by interacting with thyroid receptor. This study aimed to investigate the role of TRIP6 in breast cancer and its possible mechanism. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the expressions of TRIP6 and the transcription factor forkhead box C1 (FOXC1) in 268 breast cancer tissues, their matched adjacent tissues and 80 benign fibroadenoma tissues that were resected in Shandong Cancer Hospital from January 2011 to December 2013. COX proportional hazards regression model and Kaplan-Meier method were used to analyze the survival prognosis of breast cancer patients. The expressions of TRIP6 and FOXC1 in normal breast epithelial cells MCF-10A and breast cancer cells (BT474, MCF7 and MDA-MB-231) were detected by Western blot. MDA-MB-231 cells were transfected with TRIP6 si-RNA and si-control respectively, and cell proliferation was detected by clone formation experiment and cell counting kit-8 (CCK-8) experiment. Cell invasion was detected by transwell cell experiment. Cell migration was detected by cell scratch experiment. Western blot was used to detect relative expression of FOXC1 protein. **Results:** The positive expression rates of TRIP6 and FOXC1 in breast cancer tissues were 85.08% and 88.06%, respectively, which were higher than those in benign fibroadenoma (25.00% and 15.00%)

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2017BH061)。

通信作者: 聂刚 E-mail: yuzhimu37552434@163.com

and paracancerous tissues (55.97% and 62.31%) (all $P < 0.01$). The positive expression rates of TRIP6 and FOXC1 in breast cancer tissues were positively correlated ($r = 0.771$, $P < 0.001$). High expressions of TRIP6 and FOXC1 were independent factors affecting the overall survival and progression-free survival of breast cancer patients (both $P < 0.05$). The overall survival rate and progression-free survival rate of breast cancer patients with high expression of TRIP6 were lower than those of patients with low expression of TRIP6 (all $P < 0.001$). The overall survival rate and progression-free survival rate of breast cancer patients with high expression of FOXC1 were lower compared with patients with low expression of FOXC1 (all $P < 0.001$). The relative protein expression levels of TRIP6 and FOXC1 were higher in BT474, MCF7 and MDA-MB-231 cells than in MCF10A cells (all $P < 0.05$). The relative protein expressions of TRIP6 and FOXC1 in MDA-MB-231 cells were positively correlated ($r = 0.908$, $P = 0.033$). The number of cloned cells, proliferation viability, cell invasion, cell migration rate and relative protein expression of FOXC1 were all lower in the TRIP6 si-RNA group than in the si-control group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** TRIP6 may participate in the occurrence and development of breast cancer through FOXC1, and its high expression indicates that the survival prognosis of patient is poor.

[Key words] Thyroid receptor-interacting protein 6; Forkhead box C1; Breast cancer; Proliferation; Invasion; Migration; Prognosis

乳腺癌是临床常见的恶性肿瘤, 是女性癌症死亡的常见原因, 浸润性乳腺癌是最常见的病理学类型。中国乳腺癌病例数约占全世界的11%, 并且近年来患病率呈上升趋势^[1]。随着乳腺癌诊断和治疗技术的发展, 患者5年生存率明显提高^[2]。复发和远处转移仍然是影响乳腺癌患者预后的主要因素。阐明乳腺癌的发病机制并寻找潜在治疗靶点对改善预后有重要意义。

乳腺是激素依赖性器官, 甲状腺激素可以调控乳腺细胞的生长、分化和发育。越来越多的研究表明, 甲状腺激素及其受体可以通过影响乳腺癌细胞的增殖、侵袭、分化和代谢等, 参与乳腺癌的发生、发展过程, 可能是因为甲状腺激素具有类雌激素样作用^[3]。甲状腺激素受体相互作用蛋白6 (thyroid receptor-interacting protein 6, TRIP6) 可以与甲状腺受体相互作用, 可作为细胞黏附分子参与细胞骨架重组和细胞迁移等。近年来, 多项研究发现, TRIP6可能参与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移, 包括骨肉瘤^[4]、子宫内膜癌^[5]和胰腺癌^[6]等。TRIP6在乳腺癌中的作用及机制既往少有报道。

转录因子叉头框蛋白C1 (forkhead box C1, FOXC1) 是叉头框超家族的一个重要成员, 对细胞增殖、分化、迁移和侵袭有重要影响, 可能作为癌基因在乳腺癌中发挥作用^[7]。FOXC1基因是TRIP6的靶基因^[8]。本研究采用免疫组织化学染色法和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测乳腺癌组织及其配对的癌旁组织、乳腺良性纤维腺瘤组织中TRIP6和FOXC1的表达, 另外, 通过下调

TRIP6基因的表达观察乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的变化, 探讨TRIP6在乳腺癌中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂和仪器

正常乳腺上皮细胞MCF-10A和乳腺癌细胞 (BT474、MCF7和MDA-MB-231) 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 胎牛血清、DMEM培养基、SP免疫组织化学试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒和凝胶快速制备试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, TRIP6兔抗人多克隆抗体 (规格: 0.2 mL/200 μ g, 批号: YK0316)、山羊抗兔IgG二抗、 β -actin内参抗体均购自上海禾午生物科技有限公司, LipoFiter™脂质体转染试剂购自上海恒圆生物科技有限公司, TRIP6 si-RNA (序列为5'-CGTACCTTCCACTCGCTTTCT-3') 及si-control (序列为5'-GGAAGUUAGACA AAGAUGAGA-3') 均由上海吉玛制药技术有限公司合成并提供, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒、transwell小室均购自上海沪震实业有限公司。

细胞培养箱购自常州金坛良友仪器有限公司, IX71倒置显微镜购自日本Olympus公司, 164-5050电泳仪和iMark酶标仪均购自美国Bio-Rad公司, UVCI-2300凝胶成像仪购自美国Major Science公司。

1.2 患者资料及组织样本

选取2011年1月—2013年12月山东省肿瘤医院手术切除的268例乳腺癌组织及其配对的癌旁组织（距癌组织 ≥ 5 cm）。患者均为女性，年龄29~73岁，平均 (49.36 ± 9.80) 岁。所有患者术前均未接受放疗或化疗。组织石蜡包埋切片由山东省肿瘤医院病理科制作并储存（切片厚度为4 μm ）。术后对所有患者进行门诊和电话随访，随访截至2018年12月。另选取乳腺良性纤维腺瘤组织80例作为对照。

1.3 细胞培养

MCF-10A、BT474、MCF7和MDA-MB-231细胞置于含10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素及100 U/mL青霉素的DMEM培养液中进行培养，培养条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%。当细胞融合度达80%时进行传代，用胰蛋白酶消化，以1:3传代。取5~15代对数生长期生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.4 免疫组织化学法检测组织中TRIP6和FOXC1的蛋白水平

取组织石蜡包埋切片，脱蜡至水。将切片放置于柠檬酸盐缓冲液中微波煮沸5 min，冷却至室温。用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline, PBS）洗涤2次，每次5 min，再用蒸馏水洗涤2次，每次3 min。滴加3%过氧化氢除去内源性过氧化物酶，室温温育10 min。随后用山羊血清室温下封闭10 min，滴加TRIP6兔抗人多克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。用PBS洗涤3次，每次3 min，再用蒸馏水洗涤3次，每次3 min。滴加生物素标记的羊抗兔二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1 h，用PBS洗涤3次，每次3 min。滴加DAB显色液，苏木紫复染。经过脱水、透明、封片处理后在显微镜下观察。

每张切片随机取10个视野，每个视野计数100个癌细胞。参考Ebili等^[9]的研究，根据细胞的染色强度及阳性细胞比例判断TRIP6表达情况：① 阴性染色记0分，浅黄色1分，棕黄色2分，棕褐色3分；② $0\% \leq$ 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 记1分， $10\% <$ 阳性细胞数 $\leq 50\%$ 记2分， $50\% <$ 阳性细胞数 $\leq 80\%$ 记3分， $80\% <$ 阳性细胞数 $\leq 100\%$

记4分。将上述2个评分相乘得出最终结果：0分为阴性，1~3分为弱阳性，4~8分为中等阳性，9~12分为强阳性；0~3分为TRIP6低表达，4~12分为TRIP6高表达。

FOXC1的检测方法同上。

1.5 Western blot检测细胞中TRIP6和FOXC1的蛋白水平

取MCF-10A、BT474、MCF7和MDA-MB-231细胞，用RAPI裂解液提取总蛋白，用BCA试剂盒检测蛋白浓度，进行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分离蛋白，用半干转移法将蛋白转至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜上。5%脱脂奶粉封闭2 h，加入抗TRIP6（1:500）4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜，第2天除去一抗，用洗膜缓冲液（tris buffered saline Tween, TBST）缓冲液洗涤3次后加入羊抗兔二抗（1:500），封闭1 h。以 β -actin作为内参，电化学发光（electrochemical luminescence, ECL）仪进行蛋白成像，Image J软件分析灰度值。

FOXC1的检测方法同上。

1.6 细胞转染

以 2×10^5 个细胞/孔的密度将MDA-MB-231细胞接种于6孔板中。转染前用PBS洗涤细胞2次，加入1.8 mL无血清培养基。分别用100 μL 无血清培养基稀释10 μL LipoFiterTM和10 mL TRIP6 si-RNA（或si-control），静置5 min后将两者混匀，随后将混合物加入6孔培养板中。转染24 h后进行后续实验。

1.7 克隆形成实验和CCK-8细胞增殖实验

转染后用胰蛋白酶消化MDA-MB-231细胞，将细胞接种于6孔板中（密度为1 000个细胞/孔），37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的条件下培养3周，每2 d换液1次。当出现菌落时停止培养，弃去培养基。4%多聚甲醛溶液固定30 min后用结晶紫染色，计算每孔细胞克隆数目。

将MDA-MB-231细胞接种于6孔板中（密度为 1×10^4 个细胞/孔），用CCK-8试剂盒检测细胞活性，在培养24、48、72和96 h时，向每个培养

孔中添加10 μL CCK-8试剂, 继续培养4 h。用酶标仪在490 nm波长处读取吸光度(D)值, 以反映细胞增殖活力。

1.8 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力

在transwell迁移板上室铺基质胶, 随后将MDA-MB-231细胞接种于transwell小室(24孔, 孔径5.0 μm)中, 以 2×10^5 个细胞/mL的密度将细胞加入上室中; 下室中加入培养基。培养48 h后取出小室, 用棉签拭去微孔膜上室的细胞。用PBS冲洗小室3遍。用4%多聚甲醛溶液固定黏附于下室微孔膜下面的细胞, 结晶紫染色15 min, 干燥后在显微镜下观察, 计算侵袭细胞数。

1.9 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

转染后以 5×10^4 个细胞/孔的密度将MDA-MB-231细胞接种于6孔板中, 当细胞融合度达90%时用无菌枪头进行划痕处理。首先吸去原培养基, 然后用PBS洗涤3次, 随后加入无血清培养基继续培养。在培养0、24 h时用显微镜拍照, 划痕愈合率(%) = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度) / 0 h划痕宽度 $\times 100\%$ [10]。

1.10 统计学处理

本研究的各项实验均重复5次。应用SPSS 20.0统计软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用方差分析, 组内两两比较采用LSD检验。计数资料用率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。多因素分析采用COX比例风险回归模型。等级资料比较采用非参数检验。生存分析采用Kaplan-Meier法, 组间生存率比较采用log-rank检验。相关性分析采用Spearman秩相关分析或Pearson相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TRIP6和FOXC1在乳腺癌组织和细胞中的表达

采用免疫组织化学染色法检测268例乳腺癌组织及其配对的癌旁组织、80例乳腺良性纤维腺瘤组织中TRIP6和FOXC1的表达, 结果显示, TRIP6和FOXC1均主要在细胞质中表达(图1)。乳腺癌组织中TRIP6及FOXC1的阳

性表达率分别为85.08%和88.06%, 均高于良性纤维腺瘤组织(25.00%和15.00%)和乳腺癌癌旁组织(55.97%和62.31%) (P 均 < 0.01 , 表1)。Spearman秩相关分析结果显示, 乳腺癌组织中TRIP6与FOXC1的阳性表达率呈正相关($r=0.771$, $P < 0.001$)。

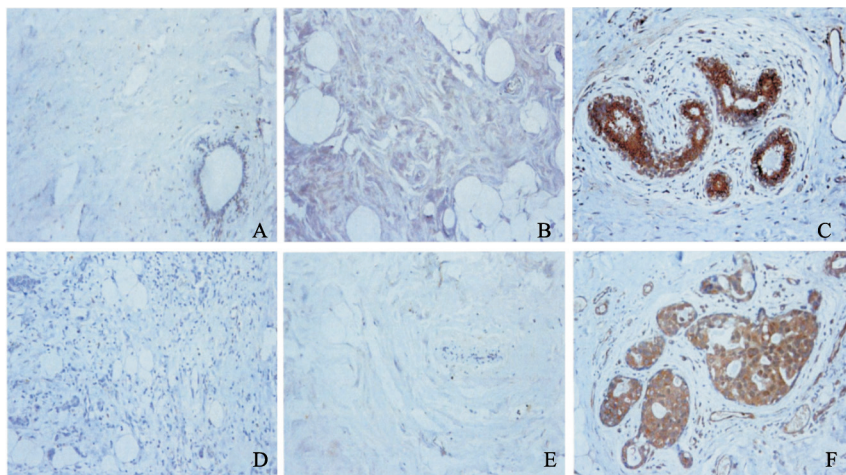
Western blot检测结果显示, MDA-MB-231细胞中TRIP6和FOXC1蛋白的相对表达量分别为 1.38 ± 0.16 和 1.20 ± 0.20 , MCF-7细胞分别为 0.59 ± 0.08 和 0.41 ± 0.09 , BT474细胞分别为 1.26 ± 0.21 和 0.92 ± 0.25 , 均高于MCF10A细胞的 0.32 ± 0.05 和 0.38 ± 0.05 (P 均 < 0.05 , 图2A)。MDA-MB-231细胞中TRIP6与FOXC1蛋白相对表达量呈正相关($r=0.908$, $P=0.033$, 图2B)。

2.2 TRIP6和FOXC1与乳腺癌预后的关系

单因素和COX多因素分析结果显示, 淋巴结转移、TNM分期为III~IV期、TRIP6高表达和FOXC1高表达是乳腺癌患者总生存时间(overall survival, OS)和无进展生存时间(progression-free survival, PFS)的独立影响因素(P 均 < 0.05 , 表2)。生存曲线分析显示, TRIP6高表达乳腺癌患者的OS率和PFS率均低于TRIP6低表达患者($\chi^2=31.112$, $P < 0.001$; $\chi^2=30.073$, $P < 0.001$); FOXC1高表达乳腺癌患者的OS率和PFS率均低于FOXC1低表达患者($\chi^2=45.897$, $P < 0.001$; $\chi^2=57.324$, $P < 0.001$, 图3)。

2.3 沉默TRIP6基因对MDA-MB-231细胞增殖、侵袭和迁移的影响

Western blot检测结果显示, TRIP6 si-RNA组TRIP6蛋白相对表达量为 0.42 ± 0.09 , 明显低于si-control组的 1.21 ± 0.08 ($P < 0.001$, 图4)。克隆形成实验检测细胞增殖的结果显示, TRIP6 si-RNA组克隆细胞数为(49.70 ± 10.34)个, 明显低于si-control组的(149.56 ± 63.78)个 ($P < 0.001$, 图5A)。CCK-8实验检测细胞增殖活力的结果显示, TRIP6 si-RNA组细胞培养第72和96 h时 D 值分别为 0.39 ± 0.05 和 0.53 ± 0.07 , 均低于si-control组的 0.58 ± 0.03 和 0.76 ± 0.07 (P 均 < 0.01 , 图5B)。Transwell小室实验检测细胞侵袭的结果显示, TRIP6 si-RNA组细胞侵袭



(×400)

图 1 免疫组织化学染色法检测良性纤维腺瘤组织、乳腺癌癌旁组织和乳腺癌组织中TRIP6和FOXC1的表达

Fig. 1 Immunohistochemical staining to detect the expressions of TRIP6 and FOXC1 in benign fibroadenoma tissue, breast cancer adjacent tissue and breast cancer tissue

TRIP6 was negatively expressed in benign fibroadenoma tissue (A) and breast cancer adjacent tissue (B). TRIP6 was positively expressed in breast cancer tissue (C). TRIP6 stained brown. FOXC1 was negatively expressed in benign fibroadenoma tissue (D) and breast cancer adjacent tissue (E). FOXC1 was positively expressed in breast cancer tissue (F). FOXC1 stained brown

表 1 TRIP6和FOXC1在良性纤维腺瘤组织、乳腺癌癌旁组织和乳腺癌组织中的表达情况

Table. 1 Expression of TRIP6 and FOXC1 in benign fibroadenoma tissue, breast cancer adjacent tissue and breast cancer tissue

Item	Case n	[n (%)]			
		-	+	++	+++
TRIP6					
Benign fibroadenoma tissue	80	60 (75.00)	20 (25.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Breast cancer adjacent tissue	268	118 (44.03)	106 (39.55)	44 (16.42)	0 (0.00)
Breast cancer tissue	268	40 (14.92)	73 (27.24)	64 (23.88)	91 (33.96)
FOXC1					
Benign fibroadenoma tissue	80	68 (85.00)	12 (15.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Breast cancer adjacent tissue	268	101 (37.69)	167 (62.31)	0 (0.00)	0 (0.00)
Breast cancer tissue	268	32 (11.94)	71 (19.29)	89 (33.21)	76 (28.36)

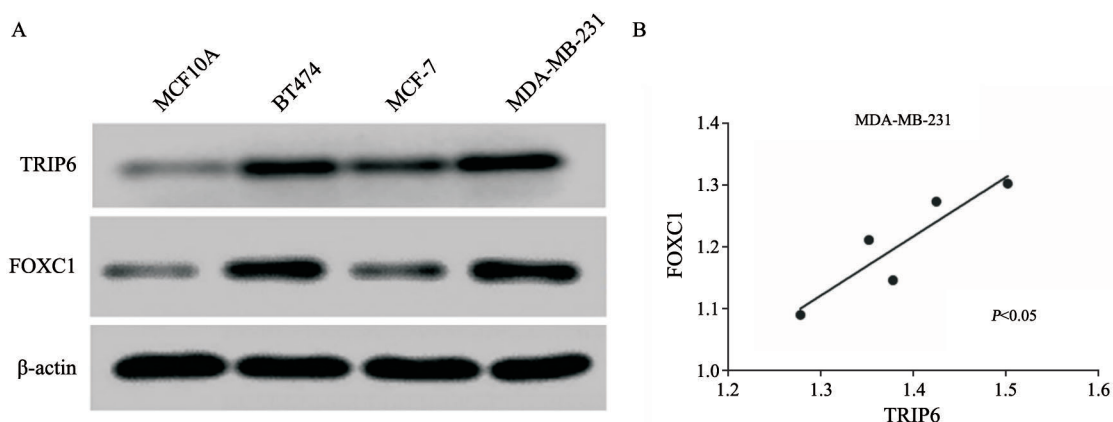


图 2 Western blot检测细胞中TRIP6和FOXC1的表达

Fig. 2 Western blot was used to detect the expressions of TRIP6 and FOXC1 in cells

A: Expressions of TRIP6 and FOXC1 in normal breast epithelial cells MCF10A and breast cancer cells (BT474, MCF7 and MDA-MB-231). B: Correlation analysis of TRIP6 and FOXC1 protein expressions in MDA-MB-231 cells

表 2 单因素和多因素分析乳腺癌患者的总体生存预后

Tab. 2 Univariate and multivariate analyses of the total survival of breast cancer patients

Variable	Univariate analysis			COX multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
OS						
Age (≥ 60 years vs < 60 years)	1.219	0.853-1.411	0.286	-	-	-
Tumor size (≥ 3 cm vs < 3 cm)	1.215	0.879-1.504	0.089	-	-	-
Lymph node metastasis (yes vs no)	1.788	1.270-2.409	0.017	1.760	1.357-3.021	0.028
TNM stage (III-IV vs I-II)	3.896	2.000-4.767	<0.001	3.702	2.036-5.128	<0.001
FOXC1 expression (high vs low)	3.124	1.785-4.190	<0.001	2.786	1.673-3.784	0.018
TRIP6 expression (high vs low)	2.908	1.321-4.300	<0.001	2.107	1.693-3.970	<0.001
PFS						
Age (≥ 60 years vs < 60 years)	1.121	0.785-1.231	0.304	-	-	-
Tumor size (≥ 3 cm vs < 3 cm)	1.332	0.910-1.907	0.097	-	-	-
Lymph node metastasis (yes vs no)	3.098	1.673-3.990	<0.001	2.879	1.783-4.123	<0.001
TNM stage (III-IV vs I-II)	2.765	1.811-4.093	<0.001	3.001	2.102-4.907	<0.001
FOXC1 expression (high vs low)	3.908	2.167-5.594	<0.001	3.786	2.117-5.301	<0.001
TRIP6 expression (high vs low)	3.003	1.703-4.121	0.001	2.764	1.673-3.784	0.020

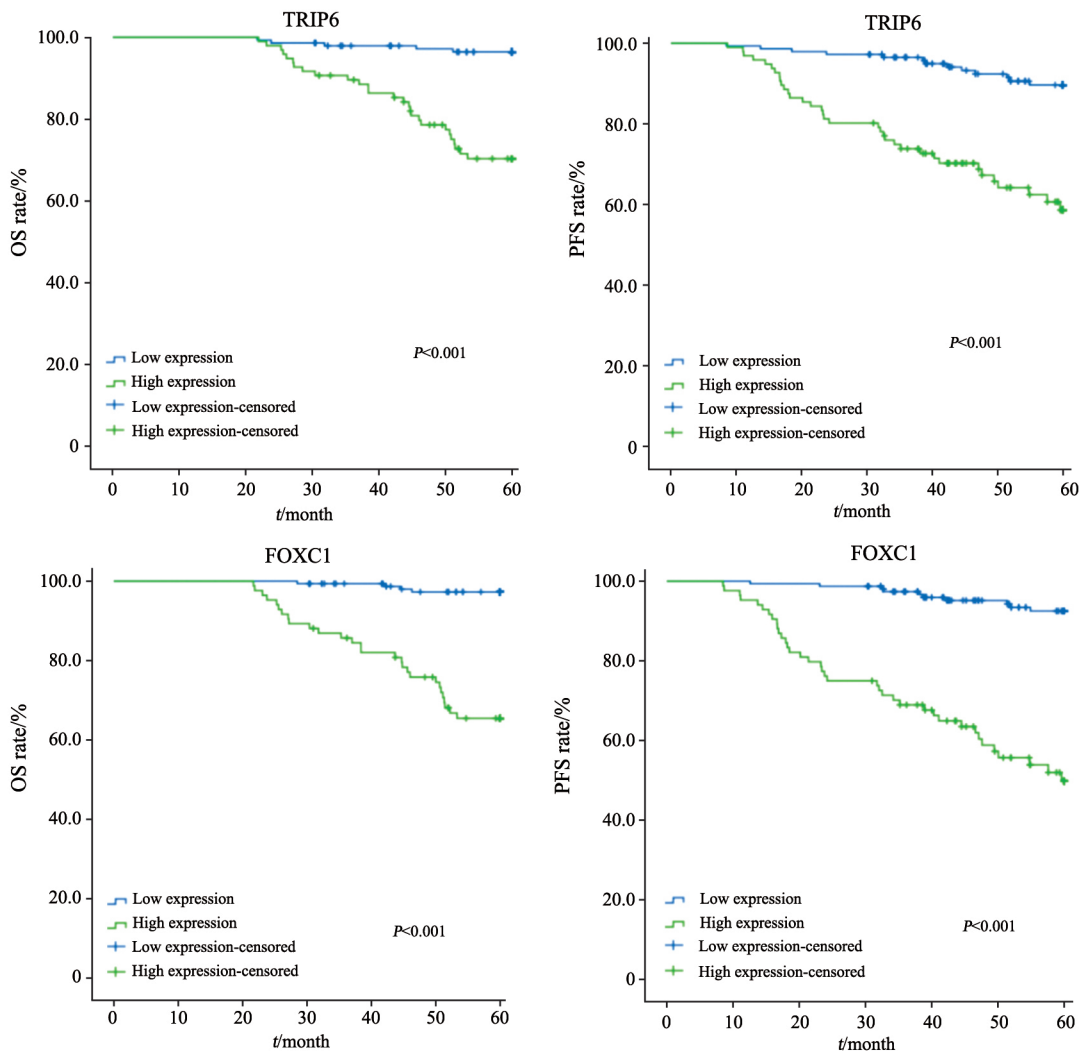


图 3 乳腺癌患者的生存曲线分析

Fig. 3 Analysis of survival curve of patients with breast cancer

数为 (31.67 ± 10.17) 个, 明显低于si-control组的 (103.56 ± 31.74) 个 ($P < 0.001$, 图5C)。细胞划痕实验检测细胞迁移的结果显示, TRIP6 si-RNA组细胞迁移率为 (19.12 ± 3.87)%, 明显低于si-control组的 (38.82 ± 8.51)% ($P < 0.01$, 图5D)。

2.4 沉默TRIP6基因对FOXC1蛋白水平的影响

Western blot检测结果显示, TRIP6 si-RNA组TRIP6蛋白相对表达量为0.18 ± 0.06, 明显低于si-control组的1.01 ± 0.08 ($P < 0.001$, 图6)。

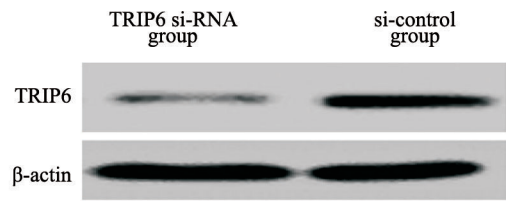


图4 沉默TRIP6基因对MDA-MB-231细胞TRIP6蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of TRIP6 gene silencing on TRIP6 protein expression in MDA-MB-231 cells

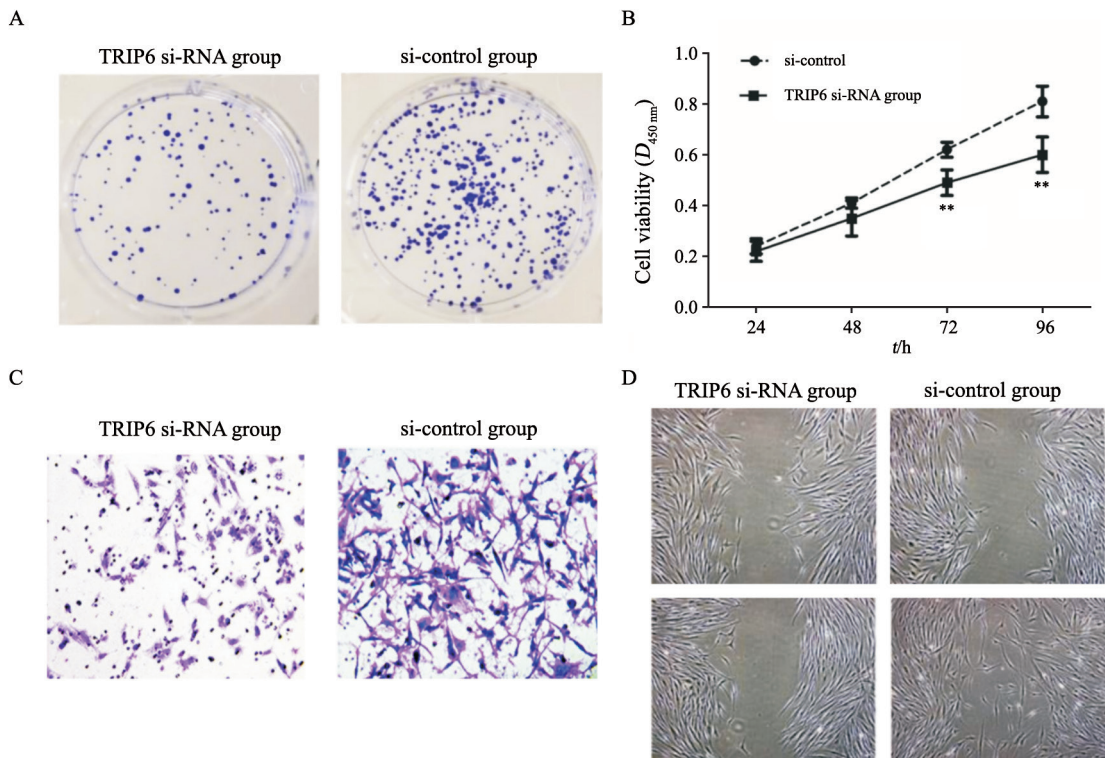


图5 沉默TRIP6基因对MDA-MB-231细胞增殖、侵袭和迁移的影响

Fig. 5 Effects of silencing TRIP6 gene on proliferation, invasion and migration of MDA-MB-231 cells

A: Clone formation experiment; B: CCK-8 cell proliferation experiment, compared with si-control group, $**P < 0.01$; C: Transwell test to detect cell invasion ability; D: Cell scratch test to detect cell migration ability

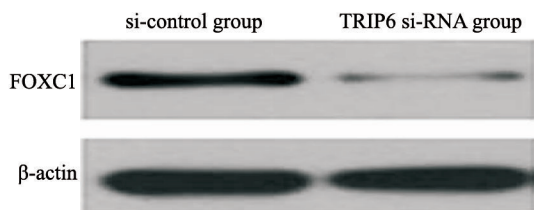


图6 沉默TRIP6基因对FOXC1蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of silencing TRIP6 gene on FOXC1 protein expression

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 严重影响患者的健康与生命^[11]。寻找乳腺癌潜在的生物学标志物对改善患者的生存预后具有重要意义。TRIP6又被称为Zyxin相关蛋白, 属于LIM蛋白Zyxin家族的一种调节蛋白^[6]。TRIP6最早被发现可以与甲状腺素受体相互作用, 之后越来越多的研究^[6, 12]证实, TRIP6

可以作为黏附分子而发挥作用, 参与细胞骨架重组、细胞间黏附、细胞凋亡、细胞侵袭、迁移和转录调控等。既往研究发现, TRIP6在骨肉瘤^[4]、子宫内膜癌^[5]、胰腺癌^[6, 13]、肝细胞癌^[8]和胃癌^[14-15]等肿瘤中高表达, 可能参与肿瘤的发生、发展, 其机制可能涉及:

① TRIP6与 α -生育酚转运蛋白相互结合, 激活Wnt/ β -catenin信号通路^[16], 促进癌细胞增殖, TRIP6通过抑制FOXO3a来抑制癌细胞增殖^[17]; ② TRIP6与TRAF6协同调节LPA2受体信号转导, 导致慢性炎症、抗凋亡和细胞侵袭^[18]; ③ TRIP6通过PI3K/AKT、Notch和MMP信号通路等促进癌细胞迁移^[6]。

本研究采用免疫组织化学染色法检测了组织中TRIP6的表达, 采用Western blot检测了细胞中TRIP6的表达, 结果显示, 乳腺癌组织中TRIP6的阳性表达率均高于乳腺良性纤维腺瘤组织和乳腺癌旁组织, 乳腺癌细胞中TRIP6的相对表达水平明显高于正常乳腺上皮细胞, 提示TRIP6可能参与乳腺癌的发生、发展过程。甲状腺激素及其受体可以通过影响乳腺癌细胞的增殖、侵袭和分化, 进而促进乳腺癌的发展。TRIP6可以与甲状腺激素受体相互作用, 进而可能调控乳腺癌的发展, 然而既往鲜有相关报道。Zhao等^[19]研究发现, TRIP6可能通过Wnt/ β -catenin信号转导通路增强乳腺癌的干细胞特性, 进而可能促进癌细胞的侵袭。本研究发现, 乳腺癌组织中、MDA-MB-231细胞中TRIP6与FOXC1的表达呈正相关, 提示TRIP6可能通过FOXC1来发挥作用。既往在肝细胞癌的研究中, Wang等^[8]已经证实FOXC1是TRIP6的靶基因。既往研究证实, FOXC1可能是乳腺癌的生物标志物, 与乳腺癌的发生、发展、化疗敏感性、预后密切相关^[20-22]。本研究发现, 沉默TRIP6基因后, MDA-MB-231细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显下降, 进一步证实TRIP6可能通过FOXC1在乳腺癌中发挥作用。

本研究的COX多因素分析和生存曲线分析显示, TRIP6和FOXC1均与乳腺癌患者的生存预后有关, 其表达水平越高, 患者生存预后越差, 提示对TRIP6/FOXC1信号转导通路的靶向干预可能

有助于改善乳腺癌患者的预后。

综上所述, TRIP6在乳腺癌的发生、发展中起重要作用, 沉默TRIP6基因可以抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 并抑制FOXC1的蛋白表达。TRIP6和FOXC1均是乳腺癌患者不良生存预后的独立影响因素, 提示对TRIP6/FOXC1信号转导通路的靶向干预可能有助于改善预后。本研究也存在一些局限性, 例如, 未检测乳腺癌患者血清中TRIP6的表达水平, 其对乳腺癌早期诊断及鉴别诊断的价值需要未来进一步分析, 也没有直接分析TRIP6与乳腺癌患者甲状腺受体的相互关系, 未分析TRIP6与凋亡、细胞周期和化疗敏感性等的关系, 而这些对深入理解乳腺癌的发生、发展过程具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] WATKINS E J. Overview of breast cancer [J]. JAAPA, 2019, 32(10): 13-17.
- [3] 田 甜, 张淑群. 甲状腺激素及其受体与乳腺癌的关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(9): 1483-1486.
TIAN T, ZHANG S Q. The relationship between thyroid hormone, thyroid hormone receptors and breast cancer [J]. J Mod Oncol, 2016, 24(9): 1483-1486.
- [4] LIU W, CHENG L, LI Q N, et al. TRIP6 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of osteosarcoma cells by activating the NF- κ B signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 2317-2325.
- [5] WANG Y F, DONG L W, LIU Y Y. Targeting thyroid receptor interacting protein 6 by microRNA-589-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in endometrial carcinoma [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2019, 34(8): 529-536.
- [6] 王 闪, 张晓兰, 林五连, 等. 甲状腺激素受体相互作用蛋白6在胰腺癌发病机制中的作用 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(1): 68-70.
WANG S, ZHANG X L, LIN W L, et al. Role of thyroid hormone receptor interacting protein 6 in the pathogenesis of pancreatic cancer [J]. Chin J Dig, 2018, 38(1): 68-70.
- [7] SABAPATHI N, SABARIMURUGAN S, MADURANTAKAM ROYAM M, et al. Prognostic significance of FOXC1 in various cancers: a systematic review and meta-analysis [J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(6): 695-706.
- [8] WANG F R, ZHANG B, XU X D, et al. TRIP6 promotes tumorigenic capability through regulating FOXC1 in

- hepatocellular carcinoma [J] . *Pathol Res Pract*, 2020, 216(4): 152850.
- [9] EBILI H O, IYAWO V O, ADELEKE K R, et al. Checkpoint kinase 1 expression predicts poor prognosis in Nigerian breast cancer patients [J] . *Mol Diagn Ther*, 2018, 22(1): 79–90.
- [10] 周明莉, 唐石伏, 张海龙, 等. Hedgehog信号通路调控Twist高表达乳腺肿瘤干细胞样细胞的富集及迁移 [J] . *肿瘤*, 2017, 37(10): 1024–1031.
- ZHOU M L, TANG S F, ZHANG H L, et al. Hedgehog signaling pathway regulates the enrichment and migration of Twist highly expressed breast cancer stem cell-like cells [J] . *Tumor*, 2017, 37(10): 1024–1031.
- [11] HARBECK N, PENAULT-LORCA F, CORTES J, et al. Breast cancer [J] . *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 66.
- [12] LIN V T, LIN F T. TRIP6: an adaptor protein that regulates cell motility, antiapoptotic signaling and transcriptional activity [J] . *Cell Signal*, 2011, 23(11): 1691–1697.
- [13] 叶婷婷, 王雯, 张晓兰. TRIP6在胰腺上皮内瘤变及胰腺癌中的表达及临床意义 [J] . *中华胰腺病杂志*, 2019, 19(1): 34–37.
- YE T T, WANG W, ZHANG X L. Expressions and clinical significance of TRIP6 in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer [J] . *Chin J Pancreatol*, 2019, 19(1): 34–37.
- [14] ZHU L R, XU X D, TANG Y J, et al. TRIP6 functions as a potential oncogene and facilitated proliferation and metastasis of gastric cancer [J] . *Biologics*, 2019, 13: 101–110.
- [15] 黄华, 姚婵, 张青, 等. TRIP6在120例胃癌组织中的表达及其临床意义 [J] . *中国肿瘤*, 2017, 26(12): 1004–1008.
- HUANG H, YAO C, ZHANG Q, et al. Expression of TRIP6 in gastric cancer and its clinical significance [J] . *China Cancer*, 2017, 26(12): 1004–1008.
- [16] GOU H, LIANG J Q, ZHANG L, et al. TTPAL promotes colorectal tumorigenesis by stabilizing TRIP6 to activate Wnt/ β -catenin signaling [J] . *Cancer Res*, 2019, 79(13): 3332–3346.
- [17] ZHAO W, DAI Y, DAI T, et al. TRIP6 promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma via suppression of FOXO3a [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(3–4): 594–601.
- [18] LIN F T, LIN V Y, LIN V T, et al. TRIP6 antagonizes the recruitment of A20 and CYLD to TRAF6 to promote the LPA2 receptor-mediated TRAF6 activation [J] . *Cell Discov*, 2016, 2: 15048.
- [19] ZHAO X H, JIANG C, XU R, et al. TRIP6 enhances stemness property of breast cancer cells through activation of Wnt/ β -catenin [J] . *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 1–11.
- [20] WANG J H, XU Y L, LI L, et al. FOXC1 is associated with estrogen receptor alpha and affects sensitivity of tamoxifen treatment in breast cancer [J] . *Cancer Med*, 2017, 6(1): 275–287.
- [21] JOHNSON J, CHOI M, DADMANESH F, et al. FOXC1 identifies basal-like breast cancer in a hereditary breast cancer cohort [J] . *Oncotarget*, 2016, 7(46): 75729–75738.
- [22] CHUNG S, JIN Y L, HAN B C, et al. Identification of EGF-NF- κ B-FOXC1 signaling axis in basal-like breast cancer [J] . *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1): 22.

(收稿日期: 2020-09-17 修回日期: 2020-12-21)