

PHB2 在乳腺癌中的表达及其对细胞增殖、迁移和侵袭的影响

裴娅婷¹, 沈玉婷¹, 王菊琴¹, 罗文武², 郭欠影², 吴正升^{1,2}

(¹ 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032;

² 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022)

摘要 **目的** 探讨抗增殖蛋白 2 (PHB2) 在乳腺癌中的表达及其对肿瘤细胞生物学行为的影响。**方法** 采用免疫组化检测乳腺癌组织中 PHB2 蛋白的表达并分析其与临床病理特征的关系。分别构建敲低和过表达 PHB2 的乳腺癌稳转细胞系, 通过克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 实验检测 PHB2 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。运用蛋白质印迹实验 (WB) 检测 PHB2 对上皮间质转化 (EMT) 相关标志物钙粘蛋白 E (E-cadherin)、钙粘蛋白 N (N-cadherin)、蜗牛家族转录抑制因子 1 (Snail) 蛋白、波形蛋白 (Vimentin) 和紧密连接蛋白 1 (Claudin-1) 表达的影响。裸鼠皮下成瘤实验检测 PHB2 对体内成瘤能力的影响。**结果** 免疫组化结果显示, PHB2 在乳腺癌中高表达并且与肿瘤大小、人表皮生长因子受体-2 (HER-2) 和增殖指数 Ki-67 显著正相关 (均 $P < 0.05$)。克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 实验结果显示, 敲低 PHB2 可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$); 过表达 PHB2 则促进其增殖、迁移和侵袭 ($P < 0.01$)。裸鼠皮下成瘤实验结果显示, 敲低 PHB2 小鼠的肿瘤体积和体质量明显减小 ($P < 0.0001$), 过表达 PHB2 肿瘤的体积和体质量明显增加 ($P < 0.001$)。WB 结果显示, 敲低 PHB2 后乳腺癌细胞的上皮标志物 E-cadherin 上调, 而间充质标志物 N-cadherin、Snail、Vimentin 下调 ($P < 0.01$); 过表达 PHB2 后乳腺癌细胞的 Claudin-1 下调, 而 N-cadherin、Snail、Vimentin 上调 (均 $P < 0.05$)。**结论** PHB2 在乳腺癌中高表达并能够促进肿瘤细胞的多种恶性生物学行为, 可能是乳腺癌诊断和治疗的潜在靶点。

关键词 乳腺癌; PHB2; 免疫组化; 迁移; 侵袭; EMT

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 占女性癌症的 31%, 死亡率占总体癌症的 15%, 并且乳腺癌发病率呈上升趋势^[1]。早期乳腺癌通常认为是可以治愈的, 探索乳腺癌早期诊断和精准分型的分子标志物对于患者治疗方案的优化和预后改善具有重要意义^[2]。抗增殖蛋白 (prohibitin, PHB) 基因编码 PHB1 和 PHB2 两种蛋白亚型, 其中 PHB2 能够定位于线粒体内膜、细胞膜和细胞核并执行不同的生物学功能, 能够参与肿瘤和其他代谢性疾病的发生发展^[3]。然而, PHB2 对乳腺癌生物学行为的影响和机制尚未见报道。因此该研究探讨 PHB2 在乳腺癌中的表达与临床病理特征的关系及其对乳腺癌增殖、迁移和侵袭的影响, 旨在为乳腺癌的早期诊断和个性化治疗提供新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集 2018 年 1 月—2019 年 11 月安徽医科大学第一附属医院病理科存档的 100 例乳腺癌石蜡标本和 50 例乳腺良性病变组织石蜡标本作为对照, 并且收集整理临床病理相关资料。乳腺癌患者年龄 29~67 岁, 平均年龄 48 岁, 病历资料完整。所有患者在手术前均未接受过任何抗癌治疗, 未合并其他恶性肿瘤。所有乳腺癌病例均由两名高年资病理学家确诊为浸润性乳腺癌 (非特殊类型)。本实验程序通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准 (批准号: 2024284)。

1.1.2 细胞 人乳腺癌细胞系 BT-549、HCC1937、CAMA-1、MDA-MB-231、MCF-7、T47D 和人胚肾细胞 293T 均购自美国 ATCC 细胞库。

1.1.3 实验动物 20 只 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司, 体质量在 (12.8 ± 1.2) g, 且均达到清洁级标准。常规饲养于基础医学院动物实验中心的小鼠笼位中。饲养环境温度恒定在 (22 ± 2) °C, 湿度 40%~70%, 独立通

2025-01-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82473059); 安徽医科大学研究生科研与实践创新项目 (编号: YJS20230103)

作者简介: 裴娅婷, 女, 硕士研究生;

吴正升, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

风,饮食供应充足。本研究获得安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准(批号:LLSC20240180)。

1.1.4 主要试剂 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;青-链霉素双抗、0.25% 胰蛋白酶、细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 ECL 显影液均购自上海碧云天生物技术公司;敲低对照质粒载体 pLKO.1 和过表达对照质粒载体 PSin-3 × FLAG 购自美国 Clontech 公司;shRNA 由上海 Sigma 公司获得;TRTzol 购自美国 Invitrogen 公司;PHB2 抗体(12295-1-AP)、钙粘蛋白 E (cadherin 1, E-cadherin) 一抗(货号:20874-1-AP)、钙粘蛋白 N (cadherin 2, N-cadherin) 一抗(货号:22018-1-AP)、紧密连接蛋白 1 (Claudin-1) 一抗(货号:28674-1-AP)、波形蛋白 (Vimentin) 一抗(货号:10366-1-AP)、蜗牛家族转录抑制因子 1 (snail family transcriptional repressor 1, Snail) 一抗(货号:26183-1-AP) 和 β -actin(货号:66009-1-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;免疫组化试剂盒、柠檬酸盐、PBS 磷酸盐缓冲剂、DAB 显色试剂盒和苏木精染液均购自福州迈新生物技术开发有限公司;配胶试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司;二甲苯、甲醇、无水乙醇和甲醛均购自合肥美丰化工仪器有限公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;雌激素购自美国 MedChemExpress 公司。

1.1.5 主要仪器 细胞培养箱(型号:ICO50)购自德国 memmert 公司;细胞计数仪(型号:JIMBIO FIL)购自江苏卓微生物科技有限公司;轮转式切片机(型号:Minux S700)购自深圳瑞沃德生命科技股份有限公司;化学发光成像系统(型号:Tanon 5200)购自上海天能公司;高速冷冻离心机(型号:Allegra x-22R)购自美国 beckman coulter 公司;多功能酶标仪(型号:enspire)购自美国 MD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胚肾细胞 293T, 人乳腺癌细胞系 CAMA-1 和 MDA-MB-231 在含有 10% 血清和 1% 青-链霉素双抗混合液的 DMEM 培养基中培养。人乳腺癌细胞系 BT-549、HCC1937、MCF-7 和 T47D 细胞在含有 10% 血清和 1% 青-链霉素双抗混合液的 RPMI 1640 中培养。培养条件为 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱。

1.2.2 免疫组化 采用 EnVision 两步法检测 PHB2 蛋白表达。切片制备、脱蜡、水化后使用柠檬酸盐修复液进行抗原修复,自来水冲洗;免疫组化笔画圈,PBS 冲洗 3 次;滴加过氧化物酶阻断剂孵育

15 ~ 30 min, PBS 冲洗;滴加 PHB2 兔抗人多克隆抗体(稀释比 1 : 200), 4 ℃ 孵育过夜。恢复室温, PBS 冲洗;滴加适量酶标抗鼠/兔 IgG 聚合物室温孵育 15 min, PBS 冲洗;DAB 显色 1 min, 自来水冲洗;苏木精孵育 30 s, 自来水冲洗, 蒸馏水洗涤数秒钟, 脱水、透明、中性树胶封固。在显微镜下观察并拍照。按照说明书选用已知心脏组织染色切片作为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。PHB2 阳性染色评分标准以细胞质和细胞膜的着色强度及着色细胞数综合判断。① 按阳性细胞着色强度计分: 未着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分;② 按阳性细胞百分比计分: 无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞数 < 25% 为 1 分, 25% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。将两项得分结果相加作为最终评分: < 3 分为低表达, ≥ 3 分为高表达^[4]。

1.2.3 慢病毒包装和稳转细胞系构建 PHB2 敲低序列 (shPHB2-1 正向引物: 5'-CCGGCCAGAA TATCTCCAAGACGATCTCGAGATCGTCTTGGAGATA TTCTGTTTTTG-3'; 反向引物: 5'-AATTCAAAAAC CAGAATATCTCCAAGACGATCTCGAGATCGTCTTGG AGATATTCTGG-3'; shPHB2-2 正向引物: 5'-CCGG GCTGAGCTTTAGCCGAGAGTACTCGAGTACTCTCGG CTAAAGCTCAGCTTTTTG-3'; 反向引物: 5'-AAT TCAAAAAGCTGAGCTTTAGCCGAGAGTACTCGAGTA CTCTCGGCTAAAGCTCAGC-3')。采用慢病毒包装技术, 以 pLKO.1 为载体, 克隆 shRNA 质粒, 将构建好的靶向敲低 PHB2 的质粒转染到 293T 细胞, 获得 shRNA 病毒, 将病毒感染目的细胞 MCF-7, 将细胞分为对照组 (shCtrl 组) 和敲低组 (shPHB2-1 组和 shPHB2-2 组), 使用嘌呤霉素筛选成功敲低 PHB2 的细胞。收集细胞在蛋白水平上检测转染效率, 用于后续实验。以同样的方法构建出过表达 PHB2 的细胞, 细胞分为对照组 (Flag 组) 和过表达组 (Flag-PHB2 组)。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验 (Western blot, WB) 使用 PBS 轻轻洗涤细胞并吸干, 使用细胞裂解液裂解细胞并进行蛋白提取。使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度后加入上样缓冲液, 置于 100 ℃ 金属浴中 10 min, 冷却后保存在 -20 ℃ 冰箱。进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 在恒流 300 mA 条件下转膜 90 min。置于浓度为 5% 的脱脂牛奶中室温封闭 1 h, 根据分子量裁剪, 条带分别放入 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Claudin-1 和 β -actin(均按 1 : 1 000 稀释) 一抗稀释液, 4 ℃ 摇床孵育过夜。使用

TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,结束后加入二抗辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 或抗兔 IgG (均按 1 : 10 000 稀释),室温孵育 45 min,使用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,接着使用 ECL 避光显影。使用 ImageJ 对结果进行灰度分析,并记录灰度数据,留作后续统计学分析。

1.2.5 克隆形成实验 常规胰酶消化细胞并计数。在 6 孔板中每孔接种 500 个细胞,每组重复 3 个孔。在 6 孔板中培养 14 d 后,取出 6 孔板,用 4% 多聚甲醛固定 2 h,最后用 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min。染色结束后用纯水洗去多余的结晶紫并晾干,随后拍照留存。克隆的数量和大小使用 ImageJ 进行测定。

1.2.6 划痕实验 将 1×10^6 个细胞接种到 6 孔板中,用完全培养基培养 24 h 使细胞长满单层。然后用 10 μ l 的移液枪枪头尖端刮除细胞单层,接着用无血清的培养基继续培养细胞,在 0、24、48 h 拍摄图像。

1.2.7 Transwell 实验 常规消化处理细胞并计数,用无血清培养基制备 5×10^4 个/孔的细胞悬液,取 200 μ l 加入无和有 Matrigel 包被的 Transwell 小室的上室中,下室加入 800 μ l 的完全培养基。培养 24 h 后取出小室,用 4% 多聚甲醛固定下层迁移的细胞 30 min,最后用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min。接着用棉签轻轻擦洗小室内壁直至棉签无明显结晶紫残留。晾干置于显微镜下拍照留存。

1.2.8 裸鼠皮下成瘤实验 将 20 只裸鼠随机分为 shCtrl、shPHB2、Flag 和 Flag-PHB2 4 组,每组 5 只,每周观察 3 次并及时补充水和饲料。其中 shCtrl 组和 shPHB2 组每只小鼠均皮下注射雌激素 1.5 mg/kg 促进雌激素受体(estrogen receptor, ER) + 乳腺癌细胞生长。取对数生长期细胞,消化计数并配制成 2×10^6 个/62.5 μ l 的细胞悬液,与同等体积基质胶混合,注射到第 2 对乳腺脂肪垫中,每只注射 125 μ l。接种后每天观察小鼠进食情况和肿瘤的生长情况,记录成瘤时间、生长速度和肿瘤大小。肿瘤相对体积公式: $V = 1/2 \times L \times W^2$, L 为小鼠瘤体的最长径, W 为垂直径。8 周后处死所有小鼠,瘤体取出拍照留存并称重。

1.2.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件和 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。两样本率的比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法检验;比较两组间均值使用 *t* 检验,两组间在同一个时间点的数据比较,采用 *t* 检验;同一个体在不同时间点的测

量采用重复测量方差分析;多组间两两比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA)。所有实验均重复 3 次以上, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHB2 在乳腺癌及乳腺良性病变组织中的表达 通过免疫组化检测 PHB2 在乳腺癌和乳腺良性病变组织中的表达情况,结果显示:PHB2 蛋白主要定位于细胞质和细胞膜;在肿瘤细胞的细胞质和细胞膜中高表达,局部细胞膜强阳性,肿瘤间质纤维细胞中少量表达,且在乳腺癌的癌巢中呈弥漫分布(图 1A);在乳腺良性病变组织的乳腺上皮细胞的细胞质中 PHB2 低表达(图 1B)。PHB2 在乳腺癌组织中高表达率(78%) 高于乳腺良性病变组(58%) ($P < 0.05$,表 1)。

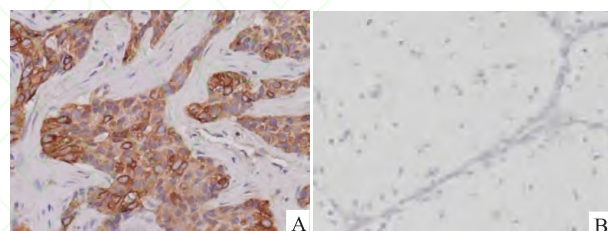


图 1 PHB2 在乳腺癌组织(A)和乳腺良性病变组织(B)中的表达
EnVision 两步法 $\times 400$

Fig.1 The expression of PHB2 in breast cancer tissues (A) and benign breast lesion tissues (B) EnVision two-step method $\times 400$

表 1 乳腺癌和乳腺良性病变组织中 PHB2 表达的比较 $n(\%)$
Tab.1 Comparison of PHB2 expression in breast cancer and benign breast lesion tissues $n(\%)$

Tissues	PHB2 protein		χ^2 value	<i>P</i> value
	High expression	Low expression		
Benign breast lesion	29 (58.0)	21 (42.0)	6.520	0.013
Breast cancer	78 (78.0)	22 (22.0)		

2.2 PHB2 在乳腺癌患者中表达的临床意义 将乳腺癌 PHB2 蛋白表达水平与患者的临床病理参数进行分析,结果如表 2 所示:PHB2 高表达的患者肿瘤直径 > 2 cm 占比更大($P = 0.029$)、ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER-2: 表达水平($P = 0.008$) 以及增殖指数 Ki-67 水平($P = 0.004$) 更高,与组织学分级、临床分期、淋巴结转移、ER 和孕激素(progesterone receptor, PR) 状态均无关(均 $P > 0.05$)。

2.3 PHB2 在人乳腺癌细胞系中的表达 通过 WB

实验分析比较 6 种乳腺癌细胞系 BT-549、HCC1937、CAMA-1、MDA-MB-231、MCF-7 和 T47D 中 PHB2 的蛋白表达,结果显示:在 6 种乳腺癌细胞系中,MCF-7 细胞中的 PHB2 蛋白表达较高,MDA-MB-231 细胞中的 PHB2 蛋白表达较低(图 2B)。因此,后续选择在 MCF-7 细胞中构建敲低稳转细胞系,在 MDA-MB-231 细胞中构建过表达稳转细胞系。

表 2 乳腺癌 PHB2 表达与患者临床病理特征的关系 $n(\%)$
Tab.2 Relationship between PHB2 expression and clinicopathologic characteristics of patients with breast cancer $n(\%)$

Clinicopathological parameter	PHB2 protein		χ^2 value	P value
	High expression	Low expression		
Age (years)			3.560	0.169
≤ 35	7 (8.97)	5 (22.73)		
36 – 55	56 (71.79)	12 (54.54)		
> 55	15 (19.23)	5 (22.73)		
Tumor size (cm)			5.180	0.029
≤ 2	39 (50.00)	17 (77.27)		
> 2	39 (50.00)	5 (22.73)		
Lymph node metastasis			0.011	>0.999
Yes	40 (51.28)	11 (50.00)		
No	38 (48.74)	11 (50.00)		
Grade			0.343	0.843
I	8 (10.26)	3 (13.64)		
II	51 (65.38)	13 (59.09)		
III	19 (24.36)	6 (27.27)		
Clinical Stage			1.486	0.252
I	7 (8.97)	4 (18.18)		
II – III	71 (91.03)	18 (81.82)		
ER			2.486	0.142
–	28 (35.90)	12 (54.55)		
+	50 (64.10)	10 (45.45)		
PR			1.598	0.291
–	21 (26.92)	9 (40.91)		
+	57 (73.08)	13 (59.09)		
Her-2			11.870	0.008
0	14 (17.95)	11 (50.00)		
1 +	13 (16.67)	5 (22.72)		
2 +	30 (38.46)	3 (13.64)		
3 +	21 (26.92)	3 (13.64)		
Ki-67			10.490	0.004
< 14%	5 (6.41)	7 (31.82)		
≥ 14%	73 (93.59)	15 (68.18)		

2.4 WB 检测敲低和过表达 PHB2 的表达效率
为研究 PHB2 对乳腺癌细胞生物学行为的影响,本实验选择在 MCF-7 细胞中转染 shPHB2 和 shCtrl 质粒,在 MDA-MB-231 细胞中转染过表达 (Flag-PHB2

组)和对照质粒 (Flag 组),用 WB 实验分别验证敲低和过表达效率。结果显示:与 shCtrl 组相比,shPHB2-1 和 shPHB2-2 组的 PHB2 蛋白表达明显降低($t = 9.48、13.79, P < 0.001$,图 3A);与 Flag 组相比,Flag-PHB2 组的 PHB2 蛋白表达明显增高($t = 50.97, P < 0.001$,图 3B),表明稳转细胞系构建成功。

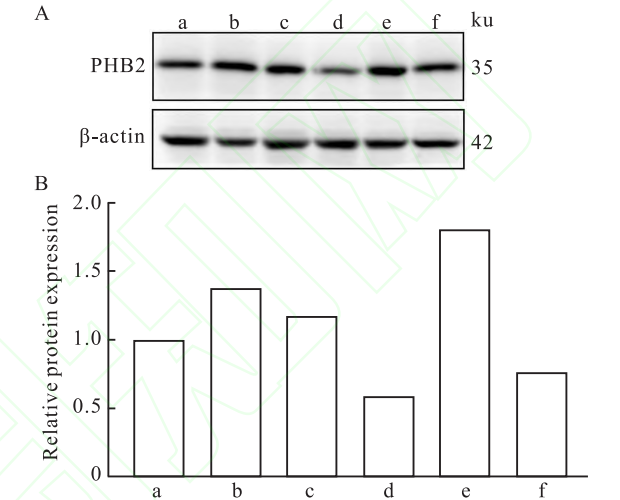


图 2 PHB2 在乳腺癌细胞系中的表达
Fig.2 PHB2 expression in breast cancer cell lines
A: Relative protein expression of PHB2 in 6 breast cancer cell lines detected by WB; B: Histogram of protein expression statistics; a: BT-549 cells; b: HCC1937 cells; c: CAMA-1 cells; d:MDA-MB-231 cells; e MCF-7 cells; f: T47D cells.

2.5 PHB2 对乳腺癌细胞克隆形成能力的影响
通过克隆形成实验检测敲低 PHB2 对 MCF-7 细胞克隆形成能力的影响及过表达 PHB2 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响,结果显示:与对照组 shCtrl 组相比,转染 shPHB2 质粒后,细胞克隆数量明显减少($t = 14.93、16.40, P < 0.001$,图 4A);与 Flag 组相比,Flag-PHB2 组的细胞数量明显增多($t = 20.30, P < 0.0001$,图 4B)。实验结果表明,敲低 PHB2 能够抑制 MCF-7 细胞的克隆形成能力,而过表达 PHB2 则能够促进 MDA-MB-231 细胞的克隆形成能力。

2.6 PHB2 对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响
划痕实验结果显示:PHB2 敲低后 MCF-7 细胞迁移率明显下降($t = 13.75、17.06$,均 $P < 0.001$,图 5A);而过表达 PHB2 组的细胞迁移率明显提高($t = 7.64, P < 0.01$,图 5B)。同样 Transwell 迁移和侵袭实验结果显示:PHB2 敲低后 MCF-7 细胞的迁移和侵袭数目明显减少(迁移: $t = 11.04、20.92$,均 $P <$

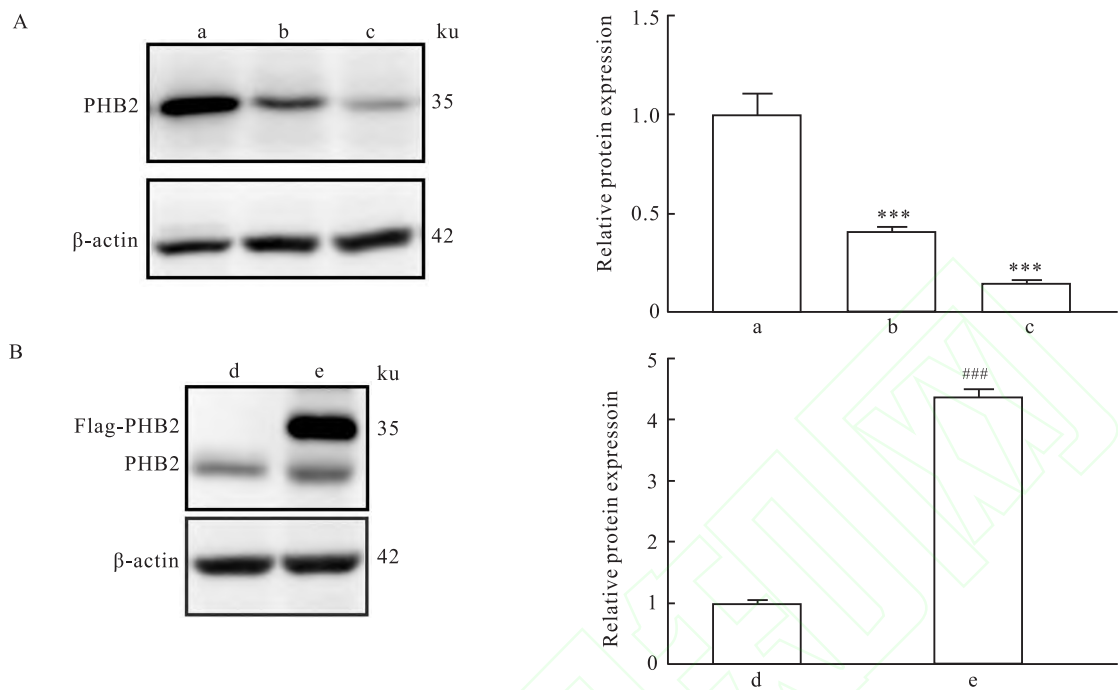


图3 WB检测敲低和过表达 *PHB2* 的效率

Fig.3 WB detection of the efficiency of knockdown and overexpression of *PHB2*

A: WB detection of *PHB2* protein expression in shCtrl group, shPHB2-1 group and shPHB2-2 group; B: WB detection of *PHB2* protein expression in Flag group and Flag-PHB2 group; a: shCtrl group; b: shPHB2-1 group; c: shPHB2-2 group; d: Flag group; e: Flag-PHB2 group; *** $P < 0.001$ vs shCtrl group; ### $P < 0.001$ vs Flag group.

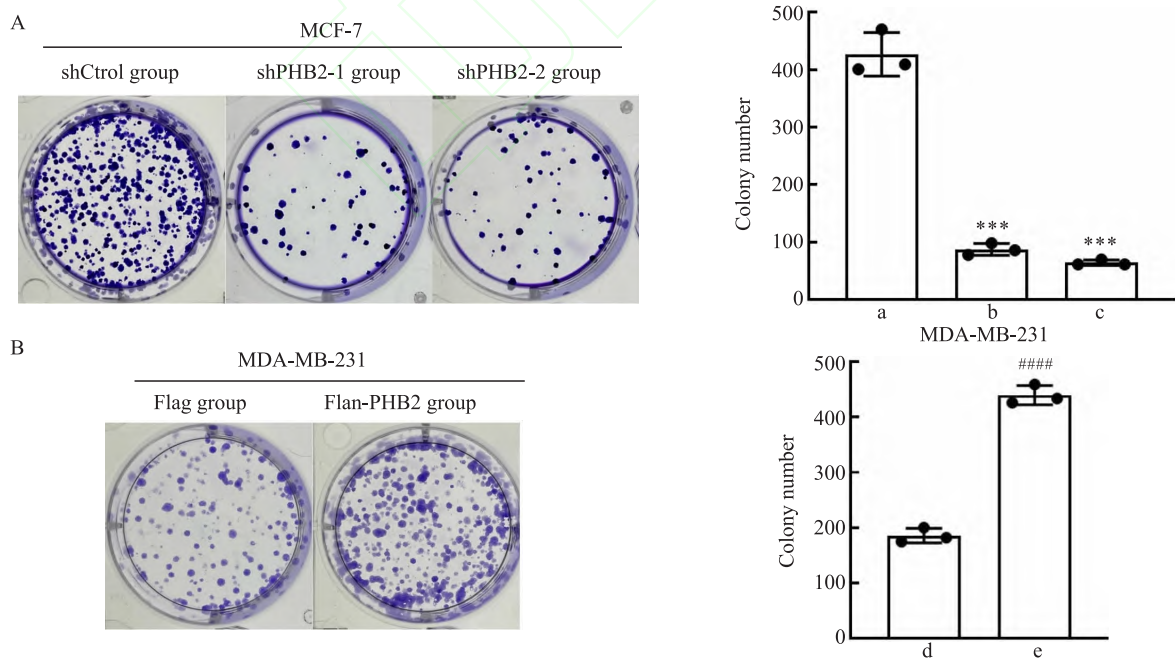


图4 *PHB2* 对乳腺癌细胞克隆形成能力的影响

Fig.4 The effect of *PHB2* on the clone forming ability of breast cancer cells

A: The effect of the knockdown of *PHB2* on the clone forming ability of MCF-7 cells was detected by plate cloning assay; B: The effect of the knockdown of *PHB2* on the clone forming ability of MDA-MB-231 cells was detected by plate cloning assay; a: shCtrl group; b: shPHB2-1 group; c: shPHB2-2 group; d: Flag group; e: Flag-PHB2 group; *** $P < 0.001$ vs shCtrl group; #### $P < 0.0001$ vs Flag group.

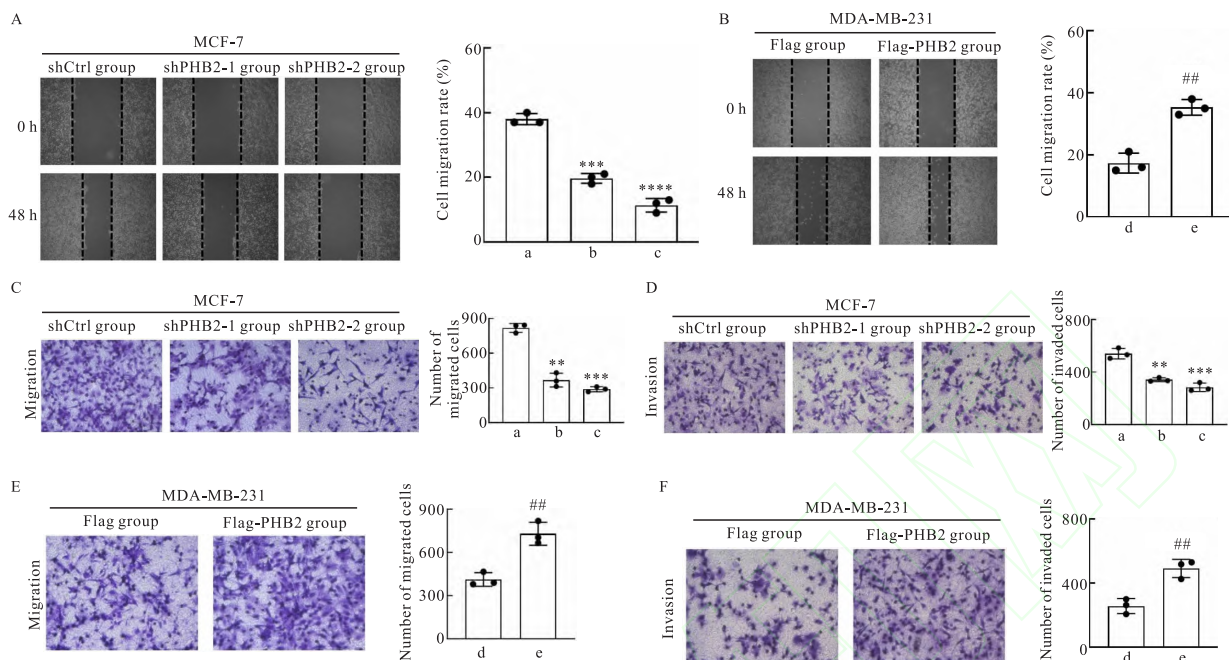


图5 PHB2对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响

Fig.5 The effect of PHB2 on the migratory invasive ability of breast cancer cells

A, B: The changes in the migratory ability of MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells after the knockdown and overexpression of *PHB2* were detected by Cell scratch assay $\times 40$; C, D: The changes in the migratory and invasion abilities of MCF-7 cells after the knockdown of *PHB2* were detected by Transwell assay, crystal violet staining $\times 200$; E, F: The changes in the migratory and invasion abilities of MDA-MB-231 cells after the overexpression of *PHB2* were detected by Transwell assay, crystal violet staining $\times 200$; a: shCtrl group; b: shPHB2-1 group; c: shPHB2-2 group; d: Flag group; e: Flag-PHB2 group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs shCtrl group; ## $P < 0.01$ vs Flag group.

0.01;侵袭: $t = 8.02, 8.62$,均 $P < 0.01$,图 5C、5D);过表达 *PHB2* 后 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭数目明显增多($t = 5.96, 5.52$,均 $P < 0.01$,图 5E、5F)。上述实验结果表明,敲低 *PHB2* 可抑制 MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力,过表达 *PHB2* 可促进 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力。

2.7 PHB2 对裸鼠皮下成瘤能力的影响 为了探索 *PHB2* 对体内肿瘤细胞成瘤能力的作用,构建裸鼠皮下移植模型,分别将敲低 *PHB2* 的 MCF-7 细胞和过表达 *PHB2* 的 MDA-MB-231 细胞注射到裸鼠的第2对乳腺脂肪垫中,观察肿瘤生长的情况。实验结果显示:与 shCtrl 组相比,敲低 *PHB2* 小鼠的肿瘤体积和体质量明显减少(体积: $F_{\text{组间}} = 179.56$, $P < 0.0001$;体质量: $t = 18.50$, $P < 0.0001$,图 6A、6B);与 Flag 组相比,过表达 *PHB2* 后的小鼠肿瘤体积和体质量明显增加(体积: $F_{\text{组间}} = 242.10$, $P < 0.0001$;体质量: $t = 5.19$, $P < 0.001$,图 6C、6D)。

2.8 PHB2 对乳腺癌上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的影响 WB 实验结果显示:与 shCtrl 组相比,敲低 *PHB2* 表达后间充质标志物 N-cadherin、Snail、Vim-

entin 表达明显下降($t = 98.37, 8.04, 7.11$,均 $P < 0.01$),而上皮标志物 E-cadherin 表达水平提高($t = 7.77$, $P < 0.01$),见图 7A;与 Flag 组相比,过表达 *PHB2* 后 N-cadherin、Snail、Vimentin 表达明显升高($t = 46.98, 7.10, 7.800$,均 $P < 0.01$),而 Claudin-1 水平明显下降($t = 4.56$, $P < 0.05$),见图 7B。实验结果表明,敲低 *PHB2* 可以抑制 MCF-7 细胞的 EMT 过程,过表达 *PHB2* 可以促进 MDA-MB-231 细胞的 EMT 过程。

3 讨论

近年来,虽然治疗方法在不断地改善,但中晚期乳腺癌患者的治疗效果仍较差。侵袭转移是中晚期癌症发展的重要原因,因此研究乳腺癌的侵袭转移有着重要意义。Li et al^[5] 研究发现驱动蛋白超家族运动蛋白 17 (kinesin superfamily motor protein 17, KIF17) 能够通过介导微管乙酰化来抑制肿瘤侵袭和转移,使用地西他滨等 DNA 甲基化酶抑制剂可提高乳腺癌细胞中 KIF17 的表达水平,可能作为治疗乳腺癌的候选药物。然而目前乳腺癌缺乏精准治疗和有效的分子靶向药物,寻找分子标志物具有一定

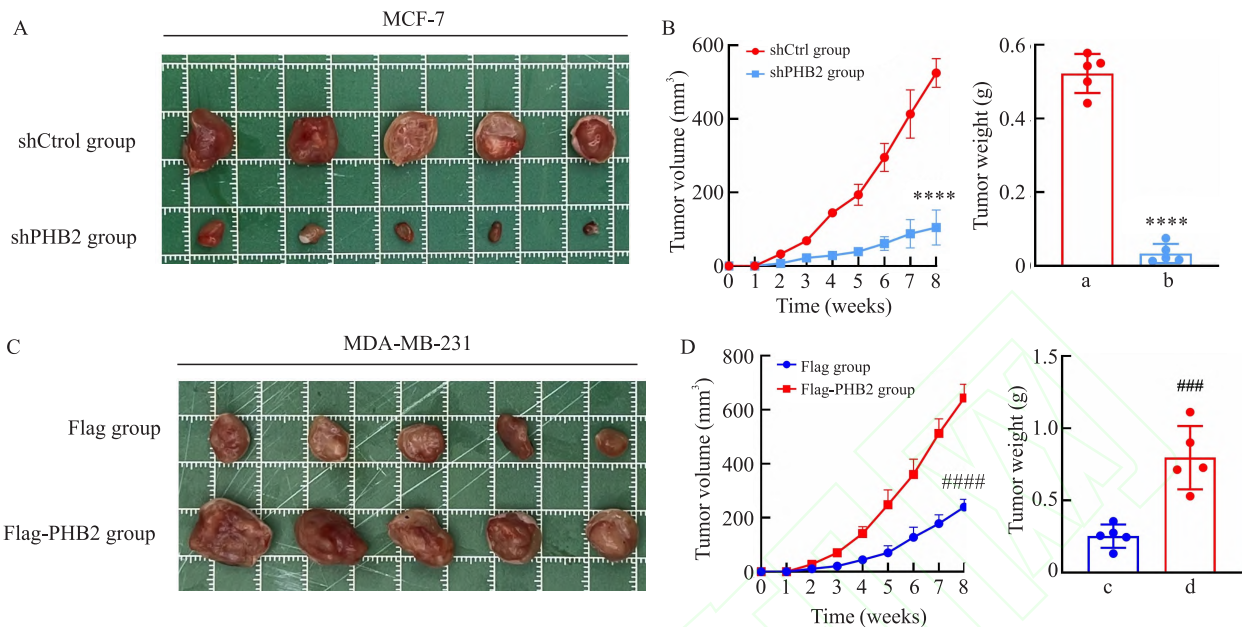


图 6 PHB2 对裸鼠皮下成瘤能力的影响

Fig. 6 The effect of PHB2 on subcutaneous tumor-forming ability in nude mice

A: Tumor images of nude mice in the knockdown *PHB2* group; B: Tumor growth curves and tumor weight statistics of nude mice with the knockdown of *PHB2* ($n=5$); C: Tumor images of nude mice in the overexpression *PHB2* group; D: Tumor growth curves and tumor weight statistics of nude mice with the overexpression of *PHB2* ($n=5$); a: shCtrl group; b: shPHB2-2 group; c: Flag group; d: Flag-PHB2 group; **** $P < 0.0001$ vs shCtrl group; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs Flag group.

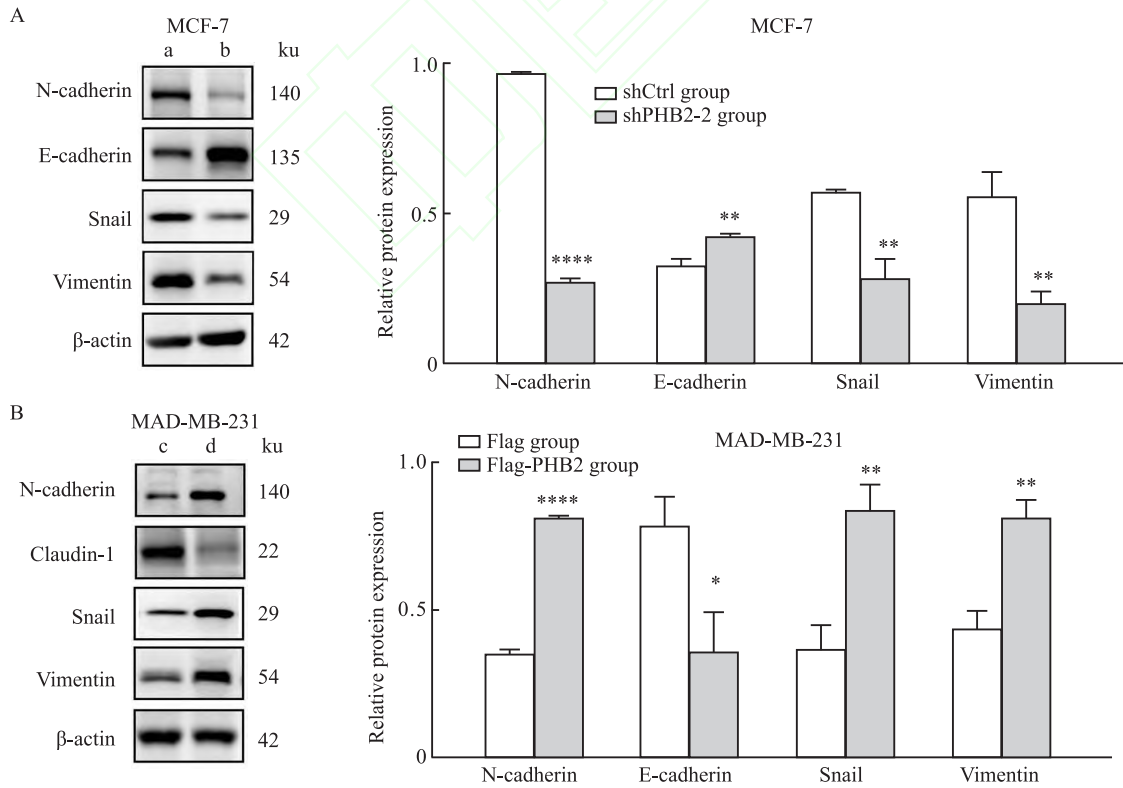


图 7 PHB2 对乳腺癌细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 7 The effect of PHB2 on the expression of EMT-related proteins in breast cancer cells

A: WB detection of EMT-related protein expression after the knockdown of *PHB2*; B: WB detection of EMT-related protein expression after the overexpression of *PHB2*; a: shCtrl group; b: shPHB2-2 group; c: Flag group; d: Flag-PHB2 group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ compared between two groups

的必要性。

PHB2 由位于染色体 12p13 上的 *PHB2* 基因编码,在许多细胞生命活动中起重要作用^[6],如有丝分裂、线粒体自噬、细胞凋亡等。PHB2 与多种疾病有关,包括糖尿病^[7]、肾脏疾病^[8]和癌症^[9]。例如, Liu et al^[7] 研究在 2 型糖尿病中,PHB2 介导的线粒体自噬可以在氧化应激下通过 Nrf2/PHB2 通路保护胰腺 β 细胞免于凋亡。Xu et al^[8] 的研究首次证明了 PHB2 在肾近端肾小管细胞中可介导受损线粒体的选择性去除,在慢性肾病中发挥保护肾脏的作用。此外,PHB2 在结直肠癌中蛋白表达上调,可通过还原型辅酶 I : 泛醌氧化还原酶核心亚基 S1 介导的氧化磷酸化来促进结直肠癌细胞的增殖和肿瘤发生^[9]。另有研究^[10] 指出使用细胞特异性适配子可鉴定 PHB2 作为管腔 A 型乳腺癌细胞的潜在生物标志物,表明 PHB2 在乳腺癌中的研究可能具有一定的价值及意义。然而,目前尚无 PHB2 在乳腺癌中生物学功能的报道,其在乳腺癌发生发展中的具体作用有待探索。

本研究首先利用免疫组化检测发现临床样本乳腺癌组织中 PHB2 蛋白的表达高于乳腺良性病变组织。先前有研究^[11] 报道使用免疫组化检测 49 对胃癌组织和匹配的癌旁非肿瘤组织,发现 PHB2 在胃癌组织中的表达水平比癌旁的非肿瘤组织高,且高水平 PHB2 与较差的预后相关,与本研究结果相似。为了进一步探索 PHB2 在乳腺癌中的生物学功能,本研究通过体外实验发现 PHB2 能够促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力,并且在体内实验发现 PHB2 能够促进裸鼠体内成瘤能力。这些结果提示 PHB2 可能是乳腺癌发生和恶性进展的一个潜在标志物。

EMT 在癌症发展过程中对组织形态发生、细胞行为和肿瘤侵袭转移都有一定的相关性,激活 EMT 可使癌细胞获得迁移、侵袭和干细胞样特性^[12]。Metge et al^[13] 研究发现低剂量替尼泊苷可以通过下调乳腺癌中锌指增强子盒结合同源盒 2 驱动的 RNA 聚合酶 I 激活靶向 EMT,可作为限制乳腺癌转移的候选药物。为了初步探索 PHB2 促进乳腺癌侵袭转移的分子机制,本研究通过 WB 实验检测 EMT 相关标志物的表达,发现 *PHB2* 敲低后上皮相关标志物表达升高,间充质相关标志物表达降低,过表达 PHB2 则与之相反。本研究结合文献报道^[14],提示 PHB2 可能通过调控肿瘤细胞 EMT 进程参与了乳腺癌的侵袭和转移。有研究^[15] 表明细胞渗透性肽抑

制剂和天然产物黄腐酚可以直接靶向 PHB2 并阻止乳腺癌的进展。

综上所述,本研究发现 PHB2 蛋白在乳腺癌组织中表达上调,与肿瘤细胞恶性进展相关,提示 PHB2 可能作为乳腺癌患者诊断和治疗的潜在分子标志物。然而,本研究尚未探索 PHB2 调控乳腺癌 EMT 的具体分子机制,有待后续深入研究。

参考文献

- [1] Giaquinto A N, Sung H, Newman L A, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(6): 477–95. doi: 10.3322/caac.21863.
- [2] Nigdelis M P, Karamouzis M V, Kontos M, et al. Updates on the treatment of invasive breast cancer; quo Vadimus? [J]. Maturitas, 2021, 145: 64–72. doi: 10.1016/j.maturitas.2020.11.006.
- [3] Qi A, Lamont L, Liu E, et al. Essential protein PHB2 and its regulatory mechanisms in cancer [J]. Cells, 2023, 12(8): 1211. doi: 10.3390/cells12081211.
- [4] Shen Y T, Huang X, Zhang G, et al. Pan-cancer prognostic role and targeting potential of the estrogen-progesterone axis [J]. Front Oncol, 2021, 11: 636365. doi: 10.3389/fonc.2021.636365.
- [5] Li T, Zhai D, Zhang M, et al. KIF17 maintains the epithelial phenotype of breast cancer cells and curbs tumour metastasis [J]. Cancer Lett, 2022, 548: 215904. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215904.
- [6] Zhang B, Li W, Cao J, et al. Prohibitin 2: A key regulator of cell function [J]. Life Sci, 2024, 338: 122371. doi: 10.1016/j.lfs.2023.122371.
- [7] Liu S, Zhang R, Zhang L, et al. Oxidative stress suppresses PHB2-mediated mitophagy in β -cells via the Nrf2/PHB2 pathway [J]. J Diabetes Investig, 2024, 15(5): 559–71. doi: 10.1111/jdi.14147.
- [8] Xu Y, Wang J, Xu W, et al. Prohibitin 2-mediated mitophagy attenuates renal tubular epithelial cells injury by regulating mitochondrial dysfunction and NLRP3 inflammasome activation [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(2): F396–407. doi: 10.1152/ajprenal.00420.2018.
- [9] Ren L, Meng L, Gao J, et al. PHB2 promotes colorectal cancer cell proliferation and tumorigenesis through NDUFS1-mediated oxidative phosphorylation [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 44. doi: 10.1038/s41419-023-05575-9.
- [10] Liu M, Wang Z, Li S, et al. Identification of PHB2 as a potential biomarker of luminal A breast cancer cells using a cell-specific aptamer [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(46): 51593–601. doi: 10.1021/acsami.2c12291.
- [11] Xu L, Xiang W, Yang J, et al. PHB2 promotes SHIP2 ubiquitination via the E3 ligase NEDD4 to regulate AKT signaling in gastric cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 17. doi: 10.1186/s13046-023-02937-1.

- [12] Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(6): 341–52. doi: 10.1038/s41580-020-0237-9.
- [13] Metge B J, Alsheikh H A M, Kammerud S C, et al. Targeting EMT using low-dose Teniposide by downregulating ZEB2-driven activation of RNA polymerase I in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 322. doi: 10.1038/s41419-024-06694-7.
- [14] 杜明珠, 张 斌. 敲低 E2F1 抑制人舌鳞癌细胞增殖及迁移的机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(12): 2127–34. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009.
- [14] Du M Z, Zhang B. The mechanism of knockdown of E2F1 inhibiting the proliferation and migration of human tongue squamous cell carcinoma cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(12): 2127–34. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009.
- [15] Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, et al. Targeting BIG3 – PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2443. doi: 10.1038/ncomms3443.

Expression of PHB2 in breast cancer and its effect on proliferation, migration, and invasion

Pei Yating¹, Shen Yuting¹, Wang Juqin¹, Luo Wenwu², Guo Qianying², Wu Zhengsheng^{1,2}

(¹*Dept of Pathology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

Abstract Objective To explore the expression of prohibitin2 (PHB2) in breast cancer and its effect on the biological behaviors of tumor cells. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of PHB2 protein in breast cancer tissues and its relationship with clinicopathologic features. Breast cancer stable transient cell lines were constructed with knockdown and overexpression of *PHB2*, respectively. The effects of PHB2 on cell proliferation, migration and invasion ability were detected by clone formation assay, scratch assay and Transwell assay. Western blot (WB) was used to detect the effects of PHB2 on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related markers, including E-cadherin, N-cadherin, Snail family transcriptional repressor 1 (Snail) protein, Vimentin, and Claudin-1. The effect of PHB2 on tumorigenicity *in vivo* was detected by subcutaneous tumor formation assay in nude mice. **Results** The result of immunohistochemical showed that PHB2 was highly expressed in breast cancer and the expression of PHB2 was significantly positive correlated with tumor size, human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) status and proliferation index Ki-67 levels ($P < 0.05$). Clone formation assay, scratch assay and Transwell assay revealed that knockdown of significantly inhibited the proliferation, migration and invasion ability of breast cancer cells ($P < 0.01$), while the overexpression of *PHB2* significantly promoted cell proliferation, migration and invasion ($P < 0.01$). The result of subcutaneous tumor formation experiment in nude mice revealed a significant decrease in tumor volume and weight in knockdown *PHB2* mice ($P < 0.0001$), while *PHB2* overexpression tumors significantly increased in volume and weight ($P < 0.001$). WB assay showed that the protein expression of epithelial marker E-cadherin increased, while the expressions of mesenchymal markers N-cadherin, Snail and Vimentin decreased significantly after *PHB2* knockdown with them in control cells ($P < 0.01$). The expression of Claudin-1 decreased, while the expressions of N-cadherin, Snail and Vimentin increased significantly in *PHB2* overexpression cells ($P < 0.05$). **Conclusion** PHB2 is highly expressed in breast cancer and promotes multiple malignant biological behaviors in tumor cells, suggesting PHB2 may be a potential target for breast cancer diagnosis and treatment.

Key words breast cancer; PHB2; immunohistochemistry; migration; invasion; EMT

Found programs National Natural Science Foundation of China (No. 82473059); Graduate Student Scientific Research and Practical Innovation Project of Anhui Medical University (No. YJS20230103)

Corresponding author Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn