DOI:10.16016/j.2097-0927.202112168

跨膜蛋白196对乳腺癌迁移及侵袭能力的影响

张 哲[1],樊 俊[1],刘文斌[2,3],徐 琰[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心乳腺甲状腺外科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系:毒理学研究所[2],军队环境卫生学教研室[3]

[摘要] **目的** 研究跨膜蛋白196(transmembrane protein 196,*TMEM*196)对乳腺癌细胞迁移及侵袭能力的影响。**方法** 研究采用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)和Oncomine数据库分析*TMEM*196在乳腺癌中的mRNA表达。通过实时定量-聚合酶链反应(quantitative real time-polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测*TMEM*196在乳腺癌细胞中的表达,利用Kaplan-Meier数据库分析*TMEM*196对乳腺癌患者预后的影响;采用组织芯片分析*TMEM*196的蛋白水平和预后作用,该队列包含70例癌旁样本和160例浸润性乳腺癌样本,年龄(53.61±13.13)岁,在2001年1月至2004年8月接受手术切除,随访时间2~150个月;通过细胞增殖、划痕愈合和Transwell实验研究*TMEM*196对乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响;Western blot检测*TMEM*196对β-连环蛋白(*β-catenin*)和基质金属蛋白酶7(matrix metalloproteinase 7,*MMP*7)表达的影响。**结果** *TMEM*196的mRNA水平和蛋白水平在乳腺癌中均显著降低($P<0.05$),在三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC)细胞株MDA-MB-231和TNBC组织中最明显($P<0.05$),低表达的*TMEM*196和较差的总体生存率(overall survival, OS)有关($HR=0.524$,95%*CI*: 0.293~0.936,$P=0.040$);过表达*TMEM*196之后能够显著抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.05$),而干扰*TMEM*196的表达后,能够显著增强细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.05$);Western blot提示*TMEM*196能够抑制*β-catenin/MMP*7信号通路从而降低乳腺癌细胞的运动能力($P<0.05$),加入*β-catenin*抑制剂后能够消除干扰*TMEM*196后所导致的促肿瘤作用($P<0.05$)。**结论** *TMEM*196通过调节*β-catenin/MMP*7信号通路抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

[关键词] *TMEM*196;乳腺癌;迁移;侵袭

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

Effect of transmembrane protein 196 on migration and invasion of breast cancer

ZHANG Zhe[1], FAN Jun[1], LIU Wenbin[2,3], XU Yan[1] [1]Department of Breast and Thyroid Surgery, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042; [2]Institute of Toxicology, [3]Department of Environmental Health, College of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of transmembrane protein 196 (*TMEM*196) on the migration and invasion of breast cancer cells. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Oncomine database were used to analyze the mRNA expression of *TMEM*196 in breast cancer. The expression of *TMEM*196 in breast cancer cells was detected by quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-qPCR). Kaplan-Meier database was employed to analyze the effect of *TMEM*196 on the prognosis of breast cancer patients. The protein level and prognostic effect of *TMEM*196 were analyzed by tissue microarray. The cohort included 70 paracancerous samples and 160 invasive breast cancer samples from the patients (53.61±13.13 years old) undergoing surgical resection from January 2001 to August 2004, with a follow-up period of 2 to 150 months. Cell proliferation experiment, scratch healing test and Transwell assay were performed to determine the effect of *TMEM*196 on the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. Western

[基金项目] 陆军军医大学临床技术创新与培养项目(CX2019LC120)

[通信作者] 徐 琰,E-mail:xy931@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

blot assay was used to explore the regulation of *TMEM*196 on the expression of *β-catenin* and matrix metalloproteinases 7 (*MMP*7). **Results** The mRNA and protein levels of *TMEM*196 were significantly decreased in breast cancer ($P<0.05$), and notably, this phenomenon was most obvious in triple negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-231 and TNBC tissues ($P<0.05$). Lower expression of *TMEM*196 was associated with poor overall survival (OS) ($HR=0.524$, 95% *CI*: 0.293~0.936, $P=0.040$). In addition, overexpression of *TMEM*196 could significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells ($P<0.05$), while its knockdown can significantly enhances the above abilities ($P<0.05$). The results of Western blot assay indicated that *TMEM*196 inhibited the *β-catenin/MMP*7 signaling pathway and reduced the motility of breast cancer cells ($P<0.05$). On the contrary, the tumor-promoting effect which caused by knockdown of *TMEM*196 could be eliminated after adding *β-catenin* inhibitor ($P<0.05$). **Conclusion** *TMEM*196 inhibits the migration and invasion of breast cancer cells by regulating the *β-catenin/MMP*7 signaling pathway.

[**Key words**] *TMEM*196; breast cancer; migration; invasion

Supported by the Clinical Technology Innovation and Cultivation Project of Army Medical University (CX2019LC120). Corresponding author: XU Yan, E-mail: xy931@163.com

乳腺癌是全球女性发病率最高的癌症,也是全球女性癌症相关死亡的主要原因[1]。据统计[2],2021 年美国有 284 00 例新增乳腺癌病例,占新发癌症病例总数的 30%;大约有 44 30 名患者死亡,占所有癌症相关死亡人数的 15%。尽管研究者已努力地研究乳腺癌的肿瘤生物学,探索了越来越多的乳腺癌生物标志物和潜在治疗靶点,但是对乳腺癌恶性进展和转移的分子机制仍然知之甚少[3-4]。因此,仍然需要进一步探索新的生物标志物和乳腺癌发生发展的潜在机制。

跨膜蛋白 196(transmembrane protein 196,*TMEM*196)位于人类染色体 7p21.1,编码一个跨膜蛋白,包含 172 个氨基酸和 4 个跨膜区域。*TMEM*196 属于跨膜蛋白家族成员,后者在基本生理过程中起关键作用,包括细胞的分化、迁移、黏附、聚集、溶解和信号转导调节[5-7]。既往研究发现,*TMEM*196 在肺癌中的表达水平降低,而甲基化水平升高,并且其高甲基化和肺癌患者较差的存活率有关[8]。然而,截至目前,尚没有关于 *TMEM*196 在乳腺癌中的作用研究,因此,本研究旨在通过实验方法初步探讨其在乳腺癌中的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 及 RPMI 1640 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清和 Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司,ViaFect™ 转染试剂和 CellTiter 96© Aqueous 细胞增殖检测试剂购自 Promega 公司,PrimeScript™ 反转录试剂盒和 2×*Taq* Master Mix 购自 TaKaRa 公司,G418、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶购自 Solarbio 公司,兔来源 *GAPDH* 抗体、*β-catenin* 抗体和 *MMP*7 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,兔来源 *TMEM*196 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231、MCF-7 和 BT474)购自中国科学院细胞库,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基常规置于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。

1.3 免疫组织化学染色

采用的组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司(序列号:HBre-Duc170Sur-01),共包含 160 个乳腺癌样本和 70 个癌旁样本,160 例住院病例均为女性患者,年龄(53.61±13.13)岁,入院诊断均为“浸润性乳腺癌”,这些病例在 2001 年 1 月至 2004 年 8 月接受手术切除,随访 2~150 个月,在研究前已获得所有患者的书面知情同意书,本研究获得上海芯超生物科技有限公司伦理委员会的批准(SHYJS-CP-1804021)。免疫组化结果由 2 名病理学家(设盲)独立阅读和解释,根据显色细胞比例,评分标准:阴性为 0 分;阳性率<25%为 1 分;阳性率 25%~<50%为 2 分;阳性率 50%~<75%为 3 分;阳性率 75%~100%为 4 分。根据细胞的染色程度,无染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕色为 3 分。将两项指标(染色强度和阳性染色细胞数)相乘,得到免疫组化评分;评分>6 则认为 *TMEM*196 高表达。

1.4 RNA 提取和实时定量-聚合酶链反应(quantitative real time-polymerase chain reaction,RT-qPCR)

根据 TRIzol 试剂说明书从细胞中分离并提取总 RNA,使用 PrimeScript™ 反转录试剂盒从 2 μg 总 RNA 中合成 cDNA,通过带有 SYBR 荧光标记的 2×*Taq*

Master Mix 进行 RT-qPCR 反应体系的配置,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算不同样品之间 mRNA 的相对表达水平,*GAPDH* 为内参照,每组设置 3 个复孔。*GAPDH* 正向引物 5′-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3′,反向引物 5′-GCCCAATACGACCAAATCAGAG-3′;*TMEM*196 正向引物 5′-ATGACCGAGGAAGGATGTGC-3′,反向引物 5′-GCCACAAAGAAGAAACGGGG-3′。

1.5 细胞转染

将乳腺癌细胞以合适的数量接种至培养皿中,待细胞长至 70%~80%,使用 ViaFect™ 转染试剂盒转染带有绿色荧光标记的 *TMEM*196 过表达或干扰质粒,转染体系如下:转染试剂 4.5 μL:质粒 1.5 μg:Opti-MEM100 μL,48 h 后用荧光显微镜观察转染情况,按照合适的浓度加入 G418 或杀稻瘟菌素筛选稳定转染的细胞 14 d,挑选稳定克隆,扩大培养,构建稳定差异表达 *TMEM*196 的乳腺癌细胞模型。

1.6 细胞增殖实验

将乳腺癌细胞以 5 000/孔接种到 96 孔板中,培养 24 h 后,用过表达或干扰 *TMEM*196 表达质粒转染细胞,使用 CellTiter 96© Aqueous 细胞增殖检测试剂分别在 0、24、48 和 72 h 测量 490 nm 处的光密度值[*D*(490)],实验分组:在过表达细胞模型中,Vector 组为对照组,*TMEM*196 组为处理组;在干扰细胞模型中,Control 组为对照组,Sh-3 和 Sh-4 为处理组。实验至少重复 3 次。

1.7 细胞划痕实验

将稳定转染的细胞以 30×10^4/孔接种于 6 孔板中,培养至单层汇合状态,融合度>90%,在 6 孔板背面做“井”字标记,用移液枪头垂直均匀划开单层细胞,分别在 0、24 和 48 h 对细胞拍照,选取视野内 3 个固定位置拍照记录,实验分组同前。

1.8 Transwell 实验

分别使用涂有或没有基质胶混合物的 Transwell 小室来评估细胞侵袭和迁移情况。将稳定转染细胞以 3×10^4/孔接种于无血清培养基的上室,下室使用含 10% FBS 的培养基作为趋化剂。孵育 24 h 后,将位于室底部的细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min,0.1%的结晶紫染色 15 min,显微镜下拍照,每孔随机选择 3 个区域对侵袭或迁移的细胞进行计数,实验分组同前。

1.9 Western blot 检测

常规方法于冰上裂解并提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白质定量 40 μg/孔,在 12%的 SDS-PAGE 中电泳 1.5 h,随后将蛋白转移到 PVDF 膜上,在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别加入 GAPDH 抗体(1∶1 000)、TMEM196 抗体(1∶1 000)、β-catenin(1∶1 000)抗体和 MMP7(1∶1 000)抗体并在 4 ℃下孵育过夜,次日将膜与二抗在室温下继续孵育 1 h 后,用 TBST 洗膜 3 次,然后显影曝光。

1.10 生物信息学分析

*TMEM*196 的 mRNA 表达通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA, https://www.cancer.gov/)数据库进行分析,预后分析通过 Kaplan-Meier 数据库(http://kmplot.com/)进行。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对样本采用 Student *t* 检验,独立样本采用 Mann-Whitney *U* 检验;两组间生存率的比较采用对数秩检验(Log-rank test)。采用双侧检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *TMEM*196 在乳腺癌中的表达

通过 TCGA 数据库分析发现,*TMEM*196 在乳腺癌组织中表达降低($P<0.05$,图 1A);RT-qPCR 检测 *TMEM*196 在乳腺癌细胞系中的表达,结果发现 *TMEM*196 在 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中表达下调($P<0.05$,图 1B),而在 BT474 细胞中的表达和正常乳腺细胞没有明显差异。

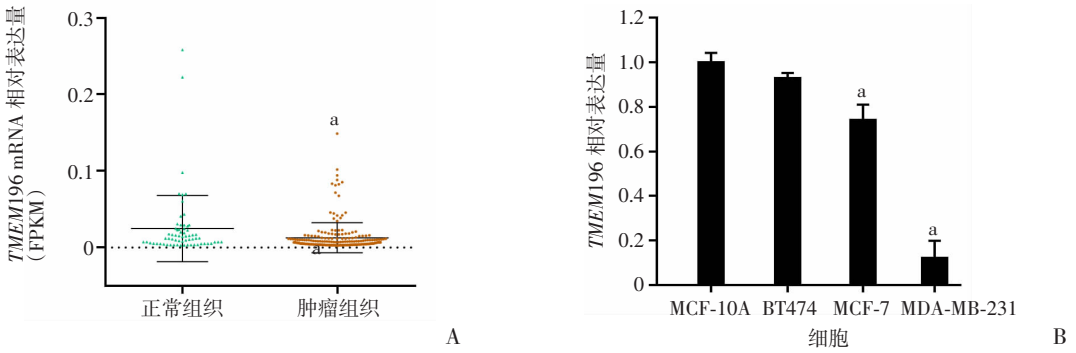
2.2 *TMEM*196 在乳腺癌中的预后作用

通过 Kaplan-Meier 数据库分析 *TMEM*196 在乳腺癌中的预后作用。结果显示,高表达的 *TMEM*196 和较好的总体生存率(overall survival, OS)有关($HR=0.720$, 95%*CI*: 0.523~0.992, $P=0.045$,图 2A);*TMEM*196 和乳腺癌患者的无复发生存率(relapse-free survival, RFS)也有较好的相关性($HR=0.643$, 95%*CI*: 0.541~0.764, $P<0.001$,图 2B)。利用 Kaplan-Meier 数据库进一步分析发现,在 4 种乳腺癌亚型中,高表达 *TMEM*196 均和 RFS 呈显著正相关($HR=0.483$、0.618、0.662、0.701, 95%*CI*: 0.321~0.728、0.475~0.805、0.459~0.955、0.508~0.966, $P<0.05$,图 2C~F)。

2.3 组织芯片验证 *TMEM*196 蛋白在乳腺癌中的表达及预后作用

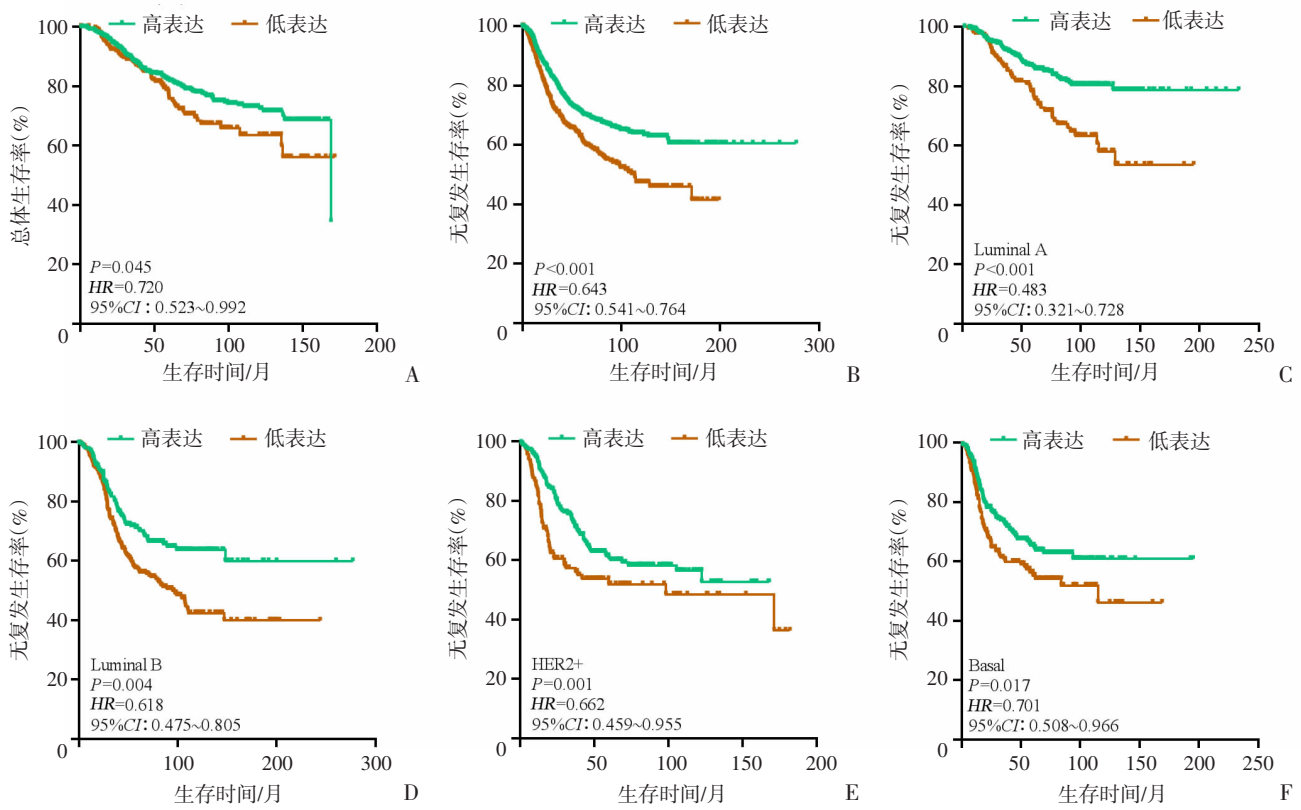
免疫组化分析结果显示,*TMEM*196 在细胞质中表达,棕黄色为阳性。*TMEM*196 在正常乳腺组织中呈现相对高表达,而在配对的癌组织中相对低表达。3 例癌组织的病理类型均为浸润性导管癌(图 3A),分子亚型分别为 HER2 过表达型乳腺癌(HER2+)、三阴型乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)和 Luminal 型乳腺癌。统计染色情况后发现,*TMEM*196 在乳腺癌组织中的蛋白水平降低($P=0.002$,图 3B),进一步分

析高/低表达样本的比例发现,正常组织高表达样本比例为62.9%(44/70),而癌组织中仅为43.1%(69/160)。根据中国临床肿瘤学会(Chinese society of clinical oncology,CSCO)乳腺癌诊疗指南2021版,将160例乳腺癌样本按照雌激素受体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)和人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)的表达情况进行分类:Luminal型(ER/PR>1%且HER2阴性);HER2+型(荧光原位杂交显示HER2阳性);TNBC(ER、PR、HER2均为阴性),最终得到81例Luminal型乳腺癌,47例HER2+型乳腺癌,32例TNBC。分析3组的*TMEM*196蛋白表达情况发现,*TMEM*196在Luminal型最高、HER2+次之、TNBC组最低($P=0.028$,图3C)。结合临床信息进行生存分析,*TMEM*196低表达患者的OS明显低于*TMEM*196高表达患者($HR=0.524$,95%*CI*:0.293~0.936,$P=0.040$,图3D)。在不同分子亚型中进行生存分析发现,高表达的*TMEM*196在不同亚型中显示较高的OS,在HER2+组中差异具有统计学意义($HR=0.232$,95%*CI*:0.067~0.801,$P=0.043$,图3E~G)。



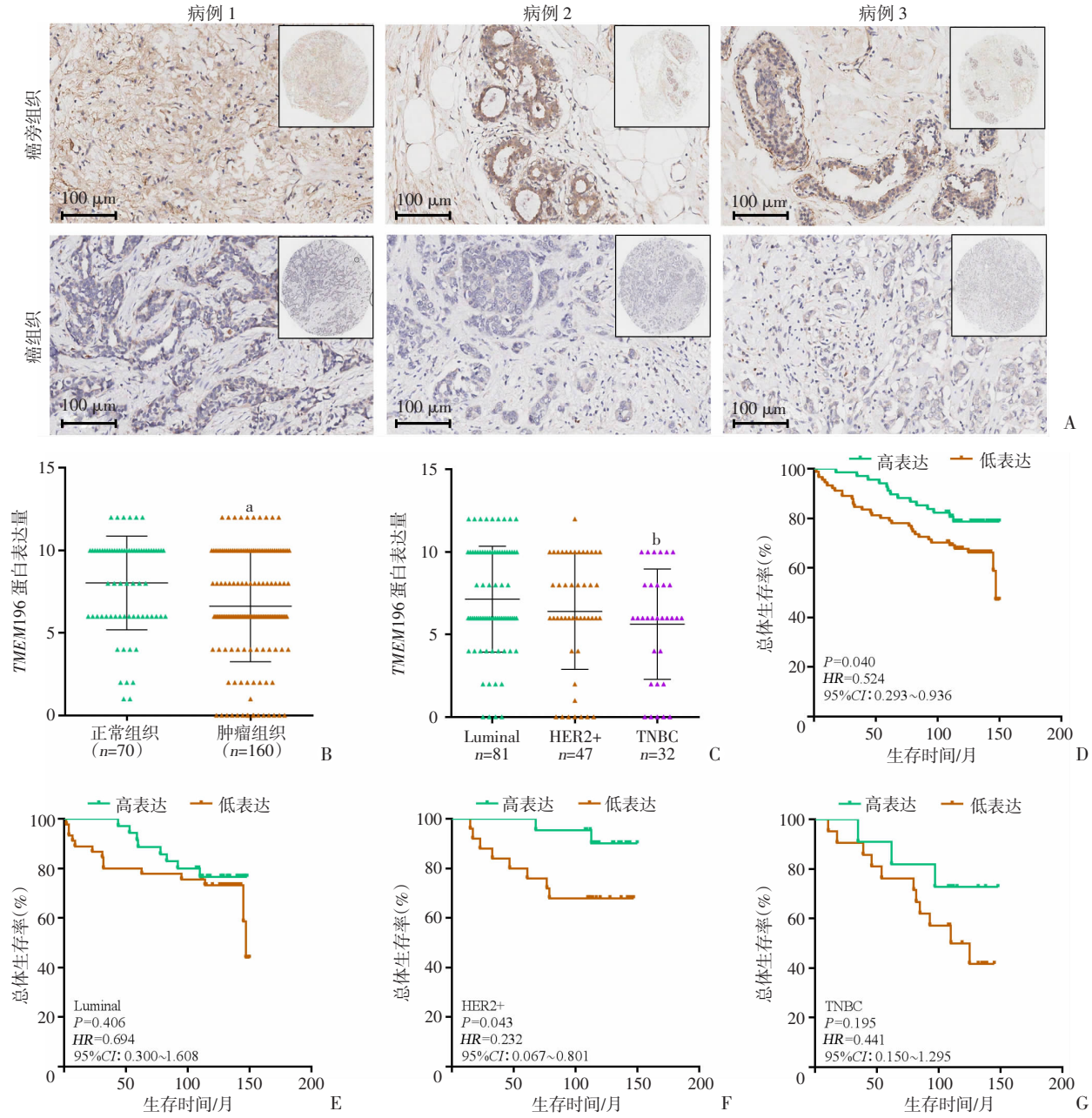
A:TCGA数据库分析*TMEM*196在正常组织和乳腺癌组织中的mRNA水平差异 a:$P<0.05$,与正常组织比较;B:RT-qPCR验证*TMEM*196在正常乳腺和乳腺癌细胞之间的表达差异 a:$P<0.05$,与MCF-10A比较

图1 *TMEM*196在乳腺癌中的表达情况分析 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:总体生存率;B:无复发生存率;C~F分别为*TMEM*196在乳腺癌Luminal A、Luminal B、HER2+和Basal 4个亚型中不同表达的患者无复发生存率

图2 Kaplan-Meier数据库分析*TMEM*196在乳腺癌中的预后情况



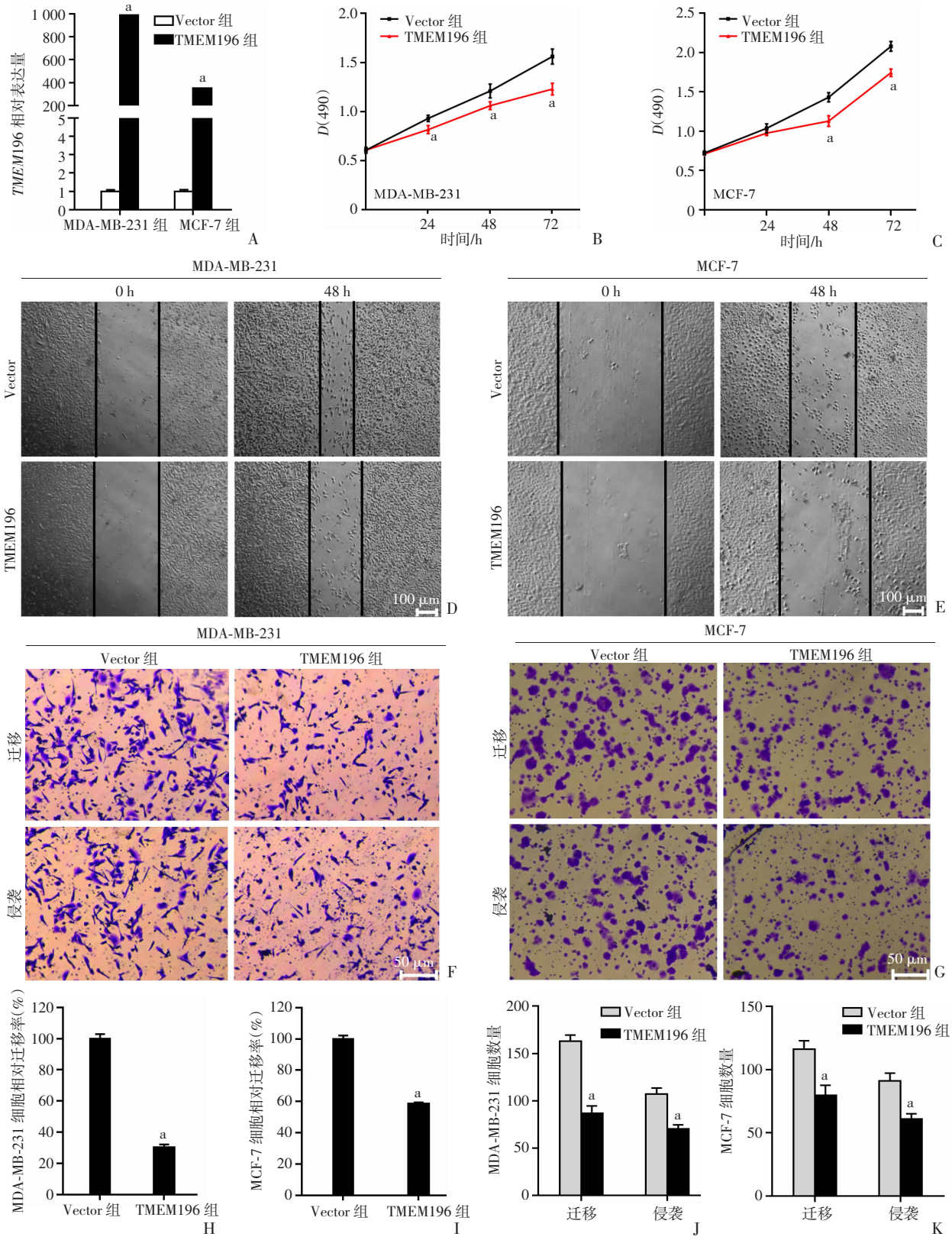
a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与 Luminal 组比较

A:*TMEM*196 在乳腺正常组织和乳腺癌组织中的染色情况对比;B:*TMEM*196 蛋白在乳腺正常组织和乳腺癌组织中的表达情况;C:*TMEM*196 蛋白在乳腺癌 Luminal 型、HER2+型和 TNBC 中的表达比较;D:*TMEM*196 蛋白在 160 例患者中不同表达的 OS;E-G:*TMEM*196 蛋白在乳腺癌 Luminal 型、HER2+型和 TNBC 中不同表达的 OS

图 3 通过组织芯片分析 TMEM196 蛋白在乳腺癌患者中的表达和预后

2.4 过表达 *TMEM*196 对乳腺癌细胞功能的影响

为探讨 *TMEM*196 在肿瘤发生中的潜在作用,将 *TMEM*196 过表达质粒转染到低表达 *TMEM*196 的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞系中,建立了稳定差异表达 *TMEM*196 的细胞模型;通过 RT-qPCR 证实外源性 *TMEM*196 的表达($P<0.05$,图 4A)。与 Vector 组相比,*TMEM*196 的异位表达抑制了 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的生长($P<0.05$,图 4B、C)。划痕实验结果显示:*TMEM*196 的过表达抑制了 MDA-MB-231($P<0.05$,图 4D、H)和 MCF-7($P<0.05$,图 4E、I)细胞的伤口愈合。Transwell 实验进一步检测过表达 *TMEM*196 之后 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的运动能力变化,与 Vector 组相比,*TMEM*196 的过表达显著抑制了 MDA-MB-231($P<0.05$,图 4F、J)和 MCF-7 细胞($P<0.05$,图 4G、K)的迁移与侵袭。



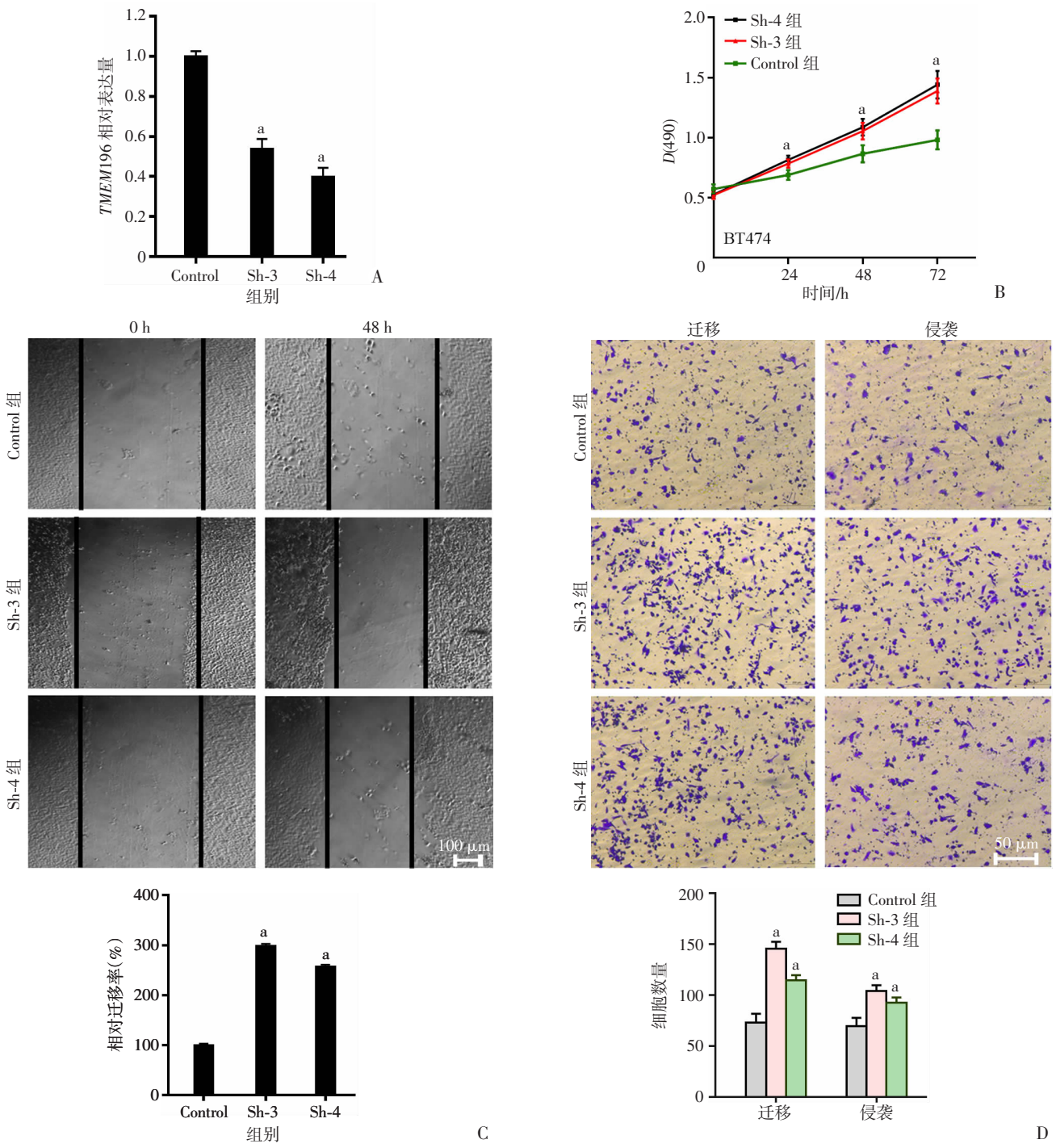
a:$P<0.05$,与 Vector 组比较

A:RT-qPCR 检测 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中 *TMEM*196 过表达;B、C:MTS 法检测 *TMEM*196 过表达对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖的影响;D、E、H、I:划痕实验检测 *TMEM*196 过表达对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞运动能力的影响;F、G、J、K:Transwell 实验检测 *TMEM*196 过表达对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞迁移及侵袭能力的影响

图 4 *TMEM*196 过表达抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.5　干扰 *TMEM*196 对乳腺癌细胞功能的影响

使用 miRNA 载体在 *TMEM*196 较高表达的 BT474 细胞系中敲除 *TMEM*196 的表达。成功转染后,RT-qPCR 检测显示 *TMEM*196 表达降低($P<0.05$,图 5A)。增殖实验显示:与 Control 组相比,干扰 *TMEM*196 后显著促进了 BT474 细胞的增殖($P<0.05$,图 5B)。划痕实验表明,与 Control 组相比,干扰 *TMEM*196 能够促进 BT474 细胞的伤口愈合能力($P<0.05$,图 5C)。同样的,干扰 *TMEM*196 之后能够促进 BT474 细胞的迁移与侵袭($P<0.05$,图 5D)。



a:$P<0.05$,与 Control 组比较

A:通过 RT-qPCR 在 BT474 细胞中检测 *TMEM*196 的干扰效果;B:MTS 法检测干扰 *TMEM*196 后对 BT474 细胞增殖的影响;C:划痕实验检测干扰 *TMEM*196 后对 BT474 细胞运动能力的影响;D:Transwell 实验检测干扰 *TMEM*196 对 BT474 细胞迁移及侵袭能力的影响

图 5　干扰 *TMEM*196 能够促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.6 TMEM196 对 β-catenin/MMP7 信号通路的影响

细胞功能实验结果显示 *TMEM*196 能够抑制乳腺癌细胞的迁移与侵袭,进一步检测 *β-catenin* 及其下游靶基因 *MMP*7 的表达变化。结果显示:与 Vector 组相比,*TMEM*196 过表达细胞中的 *β-catenin* 以及下游的 *MMP*7 明显下调($P<0.05$,图 6A);与此相反,*β-catenin* 以及下游的 *MMP*7 在干扰 *TMEM*196 细胞中表达上调($P<0.05$,图 6B)。

2.7 在干扰细胞模型中使用 β-catenin 抑制剂后细胞的功能变化

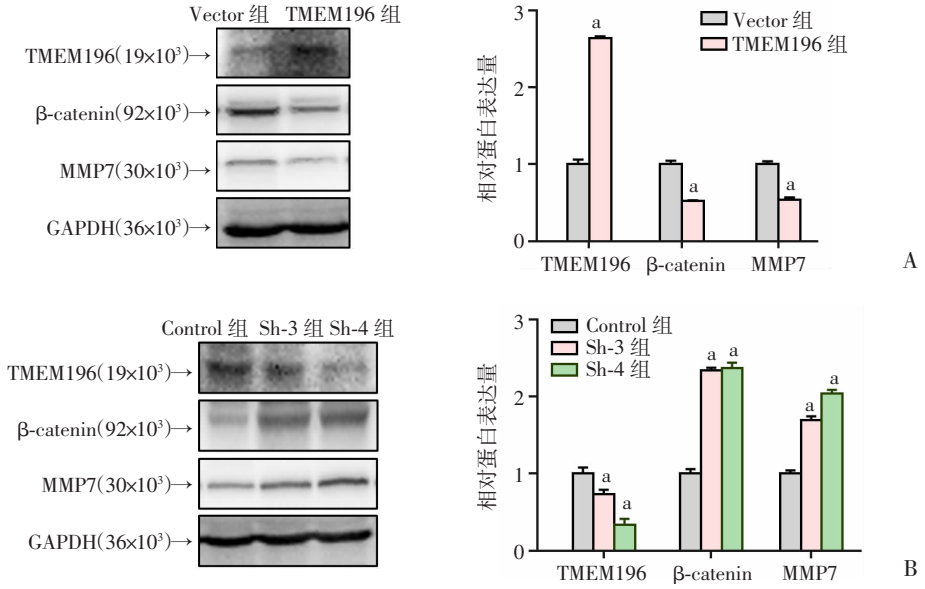
在干扰 *TMEM*196 表达的 BT474 细胞中加入 *β-catenin* 抑制剂(ICG001, Beyotime),后者可以拮抗 *Wnt/β-catenin/TCF* 介导的转录,并特异性结合到启动子结合蛋白。Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力的变化,结果显示:干扰 *TMEM*196 后细胞迁移和侵袭的数量增加;而加入 *β-catenin* 抑制剂可在一定程度上阻止这种效果($P<0.05$,图 7A)。检测 3 组中 *MMP*7 蛋白的变化显示:与 Control 组比较,Sh-4 组的 *MMP*7 蛋白明显升高,加入 *β-catenin* 抑制剂后其表达再次下降($P<0.05$,图 7B),表明 *TMEM*196 可以通过 *Wnt* 通路调控下游基因的变化,*TMEM*196 抑制 *β-catenin* 的表达,导致其下游基因 *MMP*7 的表达减少。

3 讨论

既往研究发现,*TMEM*196 在肺癌组织中甲基化水平明显升高,其高甲基化和更差的预后显著相关,提示 *TMEM*196 可以视为肺癌预后的潜在标志物[8-9]。但是,截至目前,尚没有关于 *TMEM*196 在其他肿瘤中发挥作用的相关报道,包括乳腺癌。本研究在乳腺癌中通过实验方法探索 *TMEM*196 的表达和预后,以及其对 *Wnt/β-catenin/MMP*7 信号通路的影响,对于探索乳腺癌新的预后标志物具有重要的参考价值。我们利用人群队列发现 *TMEM*196 在乳腺癌中表达降低,低表达的 *TMEM*196 和乳腺癌患者更差的预后有关;同时,利用实验方法初步发现 *TMEM*196 可以通过抑制 *β-catenin* 的表达而调控 *β-catenin/MMP*7 信号通路,从而对乳腺癌细胞的迁移及侵袭能力产生影响。我们的研究结果提示 *TMEM*196 是乳腺癌潜在的预后标志物,值得进一步深入研究与探索。

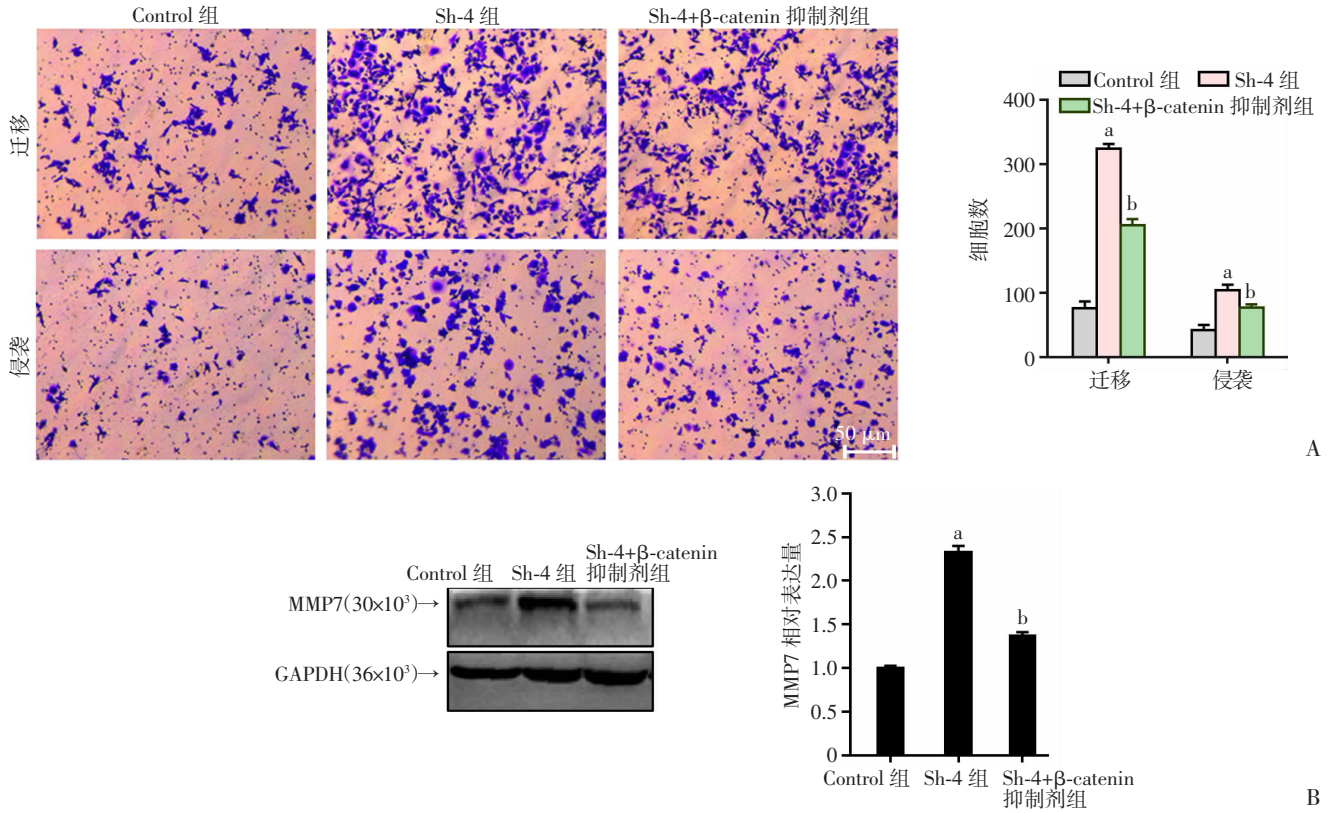
3.1 TMEM196 在乳腺癌中的研究价值

基因在肿瘤细胞中的亚细胞定位对于研究其功能执行的方式具有重要的意义。通过查找人类蛋白质图谱(human protein atlas,HPA)数据库,我们发现 *TMEM*196 定位于核质和高尔基体,通过查阅文献得知,核质是细



A:在 MDA-MB-231 细胞中过表达 *TMEM*196 后 *β-catenin* 及 *MMP*7 的变化 a:$P<0.05$,与 Vector 组比较;B:在 BT474 细胞中干扰 *TMEM*196 后 *β-catenin* 及 *MMP*7 的变化 a:$P<0.05$,与 Control 组比较

图 6 *TMEM*196 对 *β-catenin/MMP*7 信号通路的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b :$P<0.05$,与 Sh-4 组比较

A:Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭能力的变化;B:Western blot 检测各组 *MMP7* 蛋白的表达

图 7 *TMEM196* 通过抑制 *β-catenin* 的表达调控乳腺癌细胞的迁移与侵袭 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

胞核内的重要组成部分,其内包含了多种转运受体蛋白以及酶等对肿瘤的分化、凋亡、信号转导等具有重要作用的物质[10]。此外,一项关于乳腺癌的研究发现,*ZNF750* 表达的抑制显著增加了高尔基体面向划痕的细胞数量,从而促进细胞划痕愈合,说明高尔基体是细胞迁移过程中的关键参与者,并且朝向迁移方向[11],这些证据为下一步深入研究 *TMEM196* 在乳腺癌中的作用提供了可参考的信息。

TMEM196 属于跨膜蛋白家族的一员,到目前为止,仅仅只发现 *TMEM196* 在肺癌中受甲基化调控从而对预后产生了影响,然而其在人类其他癌症中的作用还是一片空白。不可否认的是,随着人类癌症研究的不断深入,越来越多的研究证实跨膜蛋白家族成员在肿瘤局部进展及远处转移过程中发挥至关重要的作用[12],包括上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)、调节细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule,ICAM)和血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule,VCAM)与血小板/中性粒细胞和内皮细胞的相互作用、钙激活氯离子通道(calcium-activated chloride channels,CaCCs)以及调节Ⅰ型干扰素(interferon,IFN)信号传导和先天免疫等。除此之外,一些跨膜蛋白被当做潜在的预后标志物,包括 *TMEM45A*、*TMEM48*、*TMEM98* 等[13-17]。上述研究结果表明跨膜蛋白家族在癌症的转移过程中扮演重要的角色。由于肿瘤的转移是非常复杂的机制,需要多种蛋白质共同参与,目前大部分跨膜蛋白在其中发挥作用的机制尚不明确,亟须深入研究。同时也说明,*TMEM196* 在乳腺癌中的作用是值得研究和发掘的。

3.2 *TMEM196* 在乳腺癌中的表达和预后

本研究发现,*TMEM196* 在乳腺癌中表达降低且与较差的预后结局(OS、RFS)有关,同时在包含 70 个正常样本和 160 个乳腺癌样本的组织微阵列验证了这一结果。*TMEM196* 的表达在 TNBC 细胞和组织中最低,同时,利用组织芯片在 TNBC 患者中进行生存分析提示 *TMEM196* 高表达和较好的预后有关;Kaplan-Meier 数据库的分析结果显示,在 Basal 乳腺癌亚型中,高表达 *TMEM196* 高表达和较好的预后有关。从病理角度来说,TNBC 是乳腺癌的一个亚组,定义为 ER-、PR-和 HER2-,而 Basal 型乳腺癌定义为表达细胞角蛋白和其他非管腔(基底)基因的基底样乳腺癌,与 TNBC 的重

叠程度达到90%[18]。因此,上述的结果具有一致性,说明 *TMEM*196 是乳腺癌潜在的预后标志物。近年来,新的组织微阵列技术可用于各种不同的阵列设计[19]。例如,包含癌症前驱病变和进展期病变样本的阵列,包含来自同一组织的正常、癌旁和恶性样本的组织型比较阵列,或者包含同一肿瘤实体的不同亚型或阶段的癌症阵列。例如,一项关于乳腺癌的研究开发了一种新的半自动循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)计数系统,叫做流体细胞微阵列芯片系统(fluidic cell microarray chip system, FCMC),可以独立于肿瘤特异性标志物或物理特性而捕获 CTC,比既往的 CTC 检测系统具有更高的灵敏度和准确性[19]。总之,组织微阵列是目前以及未来转化癌症研究的有力工具,有许多值得研究的内容有待发掘。

3.3 *TMEM*196 对乳腺癌细胞功能及下游信号通路的影响

本研究通过细胞实验发现,*TMEM*196 可以抑制乳腺癌细胞的迁移及侵袭,并且可以抑制 *β-catenin* 及其下游的 *MMP*7 的表达;而敲低 *TMEM*196 之后,*β-catenin* 和 *MMP*7 的表达也随之升高;加入 *β-catenin* 抑制剂之后,*MMP*7 的表达又进一步降低,说明 *TMEM*196 可以通过 *Wnt/β-catenin/MMP*7 通路从而调控乳腺癌细胞的运动能力。众所周知,*Wnt/β-catenin* 信号通路的激活在包括乳腺癌在内的各种癌症的发生、发展和转移中起着关键作用[20-22]。除此之外,基质金属蛋白酶7(*MMP*7)作为一种小的分泌性蛋白水解酶。它的表达与多种癌症的侵袭、迁移相关[23],一些研究表明 *MMP*7 在乳腺癌细胞和组织中均过表达[24],是 *β-catenin* 最重要的下游靶基因之一。在后续的研究中,可以在干扰 *TMEM*196 表达的基础上进一步敲低 *MMP*7,观察乳腺癌细胞的功能变化,这个结果能够更加有利的论证本研究的结论。在本研究中,我们发现 *MMP*7 是 *TMEM*196 下游的重要靶基因,以上结果表明 *TMEM*196 可能通过减弱 *β-catenin/MMP*7 信号通路来抑制乳腺癌细胞的迁移与侵袭。

3.4 研究局限及结论

本研究尚有一些不足之处:①本研究通过实验方法初步探索了 *TMEM*196 在乳腺癌中的作用及其可能作用的下游信号通路,但是 *TMEM*196 抑制乳腺癌细胞侵袭及迁移的具体分子机制目前尚不清楚,以及 *TMEM*196 如何参与调控 *β-catenin/MMP*7 信号通路尚不明确,后续需要体外验证、Co-IP 等实验进一步深入研究;同时,还可以借助免疫荧光明确 *TMEM*196 的亚细胞定位,其亚细胞定位对于理解和探索该基因执行功能的方式至关重要;②本研究初步发现 *TMEM*196 可以抑制 *β-catenin* 及其下游 *MMP*7 的表达,根据以往报道可知,包括 *c-myc* 和 *MMP*9 在内的 *β-catenin* 下游靶基因与乳腺癌远处转移和不良预后显著相关[25],*TMEM*196 与这些靶基因之间的关系尚需进一步研究。

总之,本研究发现 *TMEM*196 在乳腺癌中表达下调并且与乳腺癌预后不良有关。同时,*TMEM*196 可以通过 *β-catenin/MMP*7 信号通路抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。这些发现增加了我们对乳腺癌发生的分子机制的理解,并为癌症的诊断、治疗和预后提供了潜在的靶点。

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. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.

[3] MEI J, HAO L Y, LIU X R, *et al*. Comprehensive analysis of peroxiredoxins expression profiles and prognostic values in breast cancer[J]. Biomark Res, 2019, 7: 16. DOI: 10.1186/s40364-019-0168-9.

[4] WU S J, GUO X Y, ZHOU J J, *et al*. High expression of UNC5B enhances tumor proliferation, increases metastasis, and worsens prognosis in breast cancer[J]. Aging, 2020, 12(17): 17079-17098. DOI: 10.18632/aging.103639.

[5] NEUPERGER P, BALOG J Á, TISZLAVICZ L, *et al*. Analysis of the single-cell heterogeneity of adenocarcinoma cell lines and the investigation of intratumor heterogeneity reveals the expression of transmembrane protein 45A (TMEM45A) in lung adenocarcinoma cancer patients[J]. Cancers, 2021, 14(1): 144. DOI: 10.3390/cancers14010144.

[6] WU J W, TANG X H, YU X J, *et al*. TMEM60 promotes the proliferation and migration and inhibits the apoptosis of glioma through modulating AKT signaling[J]. J Oncol, 2022, 2022: 9913700. DOI: 10.1155/2022/9913700.

[7] KANG C F, ROSTOKER R, BEN-SHUMEL S, *et al*. TMEM176B regulates AKT/mTOR signaling and tumor growth in triple-negative breast cancer[J]. Cells, 2021, 10(12): 3430. DOI: 10.3390/cells10123430.

[8] LIU W B, HAN F, HUANG Y S, *et al*. TMEM196 hypermethylation as a novel diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(4): 474-487. DOI: 10.1002/mc.22942.

[9] LIU W B, HAN F, JIANG X, *et al*. TMEM196 acts as a novel functional tumour suppressor inactivated by DNA methylation and is a potential prognostic biomarker in lung cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(25): 21225-21239. DOI: 10.18632/oncotarget.4237.

[10] 但德苗, 郭忠建. 蛋白质核质转运的过程和应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(9): 1891-1900.
DAN D M, GUO Z J. The process and application of nucleocytoplasmic transport of proteins [J]. Chin J Cell Biol, 2021, 43(9): 1891-1900.

[11] CASSANDRI M, BUTERA A, AMELIO I, *et al*. ZNF750 represses breast cancer invasion via epigenetic control of pro-metastatic genes[J]. Oncogene, 2020, 39(22): 4331-4343. DOI: 10.1038/s41388-020-1277-5.

[12] MARX S, DAL MASO T, CHEN J W, *et al*. Transmembrane (TMEM) protein family members: poorly characterized even if essential for the metastatic process[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 96-106. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.018.

[13] HURT B, SCHULICK R, EDIL B, *et al*. Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils[J]. Am J Surg, 2017, 214(5): 938-944. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2017.08.003.

[14] SHARMA R, SHARMA R, KHAKET T P, *et al*. Breast cancer metastasis: putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1[J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(3): 199-208. DOI: 10.1007/s13402-017-0324-x.

[15] JIANG H M, CHEN H B, WAN P, *et al*. Upregulation of TMEM45A promoted the progression of clear cell renal cell carcinoma in vitro[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 6421-6430. DOI: 10.2147/JIR.S341596.

[16] JIANG X Y, WANG L, LIU Z Y, *et al*. TMEM48 promotes cell proliferation and invasion in cervical cancer via activation of the Wnt/β-catenin pathway[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(4): 371-377. DOI: 10.1080/10799893.2020.1813761.

[17] AO X D, LI X X, CHEN Y X, *et al*. TMEM98 mRNA promotes proliferation and invasion of gastric cells by directly interacting with NF90 protein[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(9): 1820-1830. DOI: 10.1002/cbin.11375.

[18] PAREJA F, JEYER F C, MARCHIO C, *et al*. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants[J]. NPJ Breast Cancer, 2016, 2: 16036. DOI: 10.1038/npjbcancer.2016.36.

[19] ZHENG K, YAO S, YAO W, *et al*. Association between RSK_2 and clinical indexes of primary breast cancer: a meta-analysis based on mRNA microarray data[J]. Front Genet, 2021, 12: 770134. DOI: 10.3389/fgene.2021.770134.

[20] CHEN Y, LI X, XU J, *et al*. Knockdown of nuclear receptor binding SET domain-containing protein 1 (NSD1) inhibits proliferation and facilitates apoptosis in paclitaxel-resistant breast cancer cells via inactivating the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 3526-3536. DOI: 10.1080/21655979.2021.2018973.

[21] PHAM S H, PRATT K, OKOLICSANYI R K, *et al*. Syndecan-1 and-4 influence Wnt signaling and cell migration in human breast cancers[J]. Biochimie, 2022: 2022Feb17; S0300-2022Feb17; S9084(22)00024-4. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.01.014.

[22] ZHANG W, RUAN X H, LI Y S, *et al*. KDM1A promotes thyroid cancer progression and maintains stemness through the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Theranostics, 2022, 12(4): 1500-1517. DOI: 10.7150/thno.66142.

[23] LIU L D, WANG L F, LI X J, *et al*. The roles of HOXB8 through activating Wnt/β-catenin and STAT3 signaling pathways in the growth, migration and invasion of ovarian cancer cells[J]. Cytotechnology, 2022, 74(1): 77-87. DOI: 10.1007/s10616-021-00508-w.

[24] HAN B C, ZHOU B, QU Y, *et al*. FOXC1-induced non-canonical WNT5A-MMP7 signaling regulates invasiveness in triple-negative breast cancer [J]. Oncogene, 2018, 37(10): 1399-1408. DOI: 10.1038/s41388-017-0021-2.

[25] NADANAKA S, KINOUCHI H, KITAGAWA H. Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/β-catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion[J]. J Biol Chem, 2018, 293(2): 444-465. DOI: 10.1074/jbc.M117.814509.

(收稿:2021-12-20;修回:2022-03-15)
(编辑 汪勤俭)