

酒精对乳腺癌细胞表皮生长因子受体-钙激活中性蛋白酶通路及细胞迁移的影响

李勇杰¹, 于庆龙¹, 潘际刚¹, 王宏健¹, 宛蕾², 王旭东¹

1. 贵州医科大学基础医学院生理学教研室, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州医科大学基础医学院药理学教研室, 贵州 贵阳 550025

[摘要] 背景与目的: 酒精(ethyl alcohol, EtOH)可促进乳腺癌的恶性演进, 但其信号机制尚未完全明了。本研究通过观察EtOH对乳腺癌细胞钙激活中性蛋白酶(calcium-activated neutral protease, CANP)-周期蛋白E/局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号通路和细胞迁移的影响, 以及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在其中的介导作用, 探讨EtOH促进乳腺癌细胞迁移的信号机制。方法: 以人乳腺癌细胞系MCF-7为模型细胞(MCF-10A乳腺上皮细胞为对照); 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)分析周期蛋白E和FAK蛋白剪切反应; 通过伤口愈合实验观察细胞迁移效应; 采用EGFR抑制剂(EGFR inhibitor, EGFR-I)或CANP抑制剂Calpeptin抑制EGFR或CANP活性, 观察抑制剂对EtOH诱导CANP1大亚基、周期蛋白E/FAK蛋白剪切及细胞迁移的影响。结果: 以EtOH(0.3%)处理模型细胞可观察到周期蛋白E和FAK出现明显蛋白剪切且该效应呈剂量和时间依赖性, 还观察到EtOH刺激细胞迁移活动(+47.30%, $P<0.05$), 但EtOH对MCF-10A细胞迁移无明显影响; 以Calpeptin(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理模型细胞, 可见EtOH(0.3%)或EGF(10 ng/mL)诱导的周期蛋白E/FAK蛋白剪切效应受到明显抑制; EGFR-I(3 $\mu\text{mol/L}$)可显著抑制EtOH诱导的CANP1大亚基和周期蛋白E/FAK蛋白剪切及细胞迁移效应(-53.00%, $P<0.01$)。结论: EtOH可通过EGFR激活乳腺癌细胞CANP信号活动并促进细胞迁移, EGFR-CANP通路参与介导EtOH与EGF之间的串话, 提示EGFR-CANP信号通路中的关键分子可为防止乳腺癌转移的潜在药物靶点。

[关键词] 酒精; 表皮生长因子受体; 钙激活中性蛋白酶; 细胞迁移; 乳腺癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.10.003

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)10-0820-06

Impacts of ethanol on the epidermal growth factor receptor (EGFR) -calpain signaling and migration in breast cancer cells LI Yongjie¹, YU Qinglong¹, PAN Jigang¹, WANG Hongjian¹, WAN Lei², WANG Xudong¹ (1.Department of Physiology, Guizhou Medical University School of Basic Medicine, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2 Department of Pharmacology, Guizhou Medical University School of Basic Medicine, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

Correspondence to: Wang Xudong E-mail: 1157102188@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** Ethanol has been reported to stimulate progression of breast cancer, yet the underlying mechanism is not fully understood. This study aimed to investigate effects of ethyl alcohol (EtOH) on the calcium-activated neutral protease (CANP)-cyclin E/focal adhesion kinase (FAK) signaling and cell migration in breast cancer cells, as well as the role of epidermal growth factor receptor (EGFR) in the EtOH-stimulated effects, in order to assess the signaling mechanism(s) underlying how EtOH enhances cancer progression. **Methods:** Human breast cancer cell line MCF-7 was employed as a model system, with MCF-10A mammary epithelial cells as control. In vitro wound healing assay was carried out to evaluate EtOH-induced cell migration. The effects of EtOH or epidermal growth factor on the proteolysis of cyclin E/FAK were detected by Western blot. EGFR inhibitor (EGFR-I) and a specific inhibitor

for CANP, Calpeptin, were applied to pretreat cultured cells to explore their influences on the cell migration and cyclin E/FAK proteolysis triggered by EtOH. **Results:** Treatment of model cells with EtOH (0.3%) stimulated significant proteolysis of cyclin E/FAK in a dose-/time-dependent manner and increased migration (+47.30%, $P<0.05$) in MCF-7 breast cancer cells, but had no significant effect on migration in MCF-10A cells. Pretreatment with Calpeptin (10 $\mu\text{mol/L}$) significantly reduced EtOH (0.3%)- or EGFR (10 ng/mL)-induced cyclin E/FAK truncation. EGFR-I (3 $\mu\text{mol/L}$) profoundly reduced EtOH-induced CANP dependent proteolysis of CANP1 and cyclin E/FAK as well as cell migration (-53.00%, $P<0.01$). **Conclusion:** EtOH significantly stimulates activation of CANP via EGFR pathway, resulting in proteolysis of cyclin E/FAK and migration in MCF-7 breast cancer cells, suggesting EGFR-CANP signaling to be a potential target for suppression of metastasis in breast cancer.

[**Key words**] Ethanol; Epidermal growth factor receptor; Calcium-activated neutral protease; Migration; Breast cancer

包括乳腺癌在内的恶性肿瘤的主要致死原因在在于肿瘤远处脏器转移。酒精(ethyl alcohol, EtOH)与乳腺癌发病的关系已经得到流行病学数据的支持^[1]。近年来的研究资料显示, EtOH还可能参与促进乳腺癌的侵袭和转移^[2-5], 从而影响乳腺癌患者的生存率。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)参与促进乳腺癌的发展^[6], 乳腺癌细胞中高活性钙激活中性蛋白酶(calcium-activated neutral protease, CANP)及CANP依赖性周期蛋白E蛋白剪切与乳腺癌的不良预后显著相关^[7-9]。肿瘤细胞的迁移活动是乳腺癌转移的早期和限速步骤之一。然而, EtOH是否可通过EGFR刺激乳腺癌细胞CANP信号活动及细胞迁移, 目前还未见文献报道。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂

人乳腺癌细胞MCF-7(ER+)购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。MCF-10A乳腺上皮细胞由重庆第三军医大学生物化学教研室惠赠。培养基(Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)、无酚红DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶及青霉素-链霉素购自美国HyClone公司; 活性炭处理胎牛血清(charcoal-stripped fetal bovine serum, CS-FBS)购自法国BioWest公司; 二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自美国MPBio公司; 人表皮生长因

子(epidermal growth factor, EGF)购自英国Peprotech公司; 钙蛋白酶抑制剂Calpeptin购自德国Calbiochem公司; 抗周期蛋白E和局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)单克隆抗体、抗 β -actin抗体、羊抗小鼠IgG-HRP及羊抗兔IgG-HRP购自美国Santa Cruz公司; EtOH购自美国Sigma-Aldrich公司; EGFR抑制剂(EGFR inhibitor, EGFR-I)购自德国Merk公司。

1.2 细胞培养

MCF-7细胞培养在DMEM(高糖, 含10%FBS和1%青霉素-链霉素)中。MCF-10A细胞在含10%马血清、10 ng/mL霍乱毒素、10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、50 ng/mL氢化可的松、20 ng/mL EGF及1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养液中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的培养箱中培养。

1.3 EtOH处理

细胞在有酚红完全培养基中培养自60%满度后, 换成加2.5%CS-FBS的无酚红DMEM培养24 h, 再以无血清、无酚红DMEM继续培养24 h, 然后按实验要求加入体积分数0~0.5%的EtOH处理0~24 h。

1.4 EGFR及CANP抑制剂作用的观察

实验细胞分为EtOH(0.3%)组、EtOH(0.3%)+Calpeptin(15 $\mu\text{mol/L}$)组、EGFR-I(3 $\mu\text{mol/L}$)组和EtOH(0.3%)+EGFR-I(3 $\mu\text{mol/L}$)组, 按实验要求加入相应抑制剂预处理模型细胞, 再加入EtOH处理0~24 h观察细胞迁移变化或裂解细胞提取蛋白定量后进行蛋白印迹分析。

1.5 伤口愈合实验检测细胞迁移能力

细胞种植在12孔板中, 有酚红条件下培养至90%~100%满度后, 无菌条件下用200 μ L枪头在培养皿底作轻柔十字划痕, 形成单细胞层无细胞区(宽约1.5 mm), 然后以PBS清洗2~3次, 以除去漂浮细胞。根据实验要求, 更换有酚红或无酚红培养基(含1.5%CS-FBS)继续培养, 按实验要求加入药物处理。于倒置显微镜下, 分别在0和24 h时间点照相, 观察和分析对照组和处理组划痕宽度的变化。各实验组24 h细胞迁移距离(mm)=24 h划痕宽度 - 0 h划痕宽度; 24 h细胞迁移率=(24 h对照组划痕宽度 - 24 h处理组划痕宽度)/24h对照组划痕宽度 \times 100%。

1.6 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测目标蛋白相对分子质量变化

细胞培养至70%满度, 按实验要求处理细胞后, 加入RIPA细胞裂解液(使用前20 min加蛋白酶抑制剂使其终浓度为1 mmol/L), 在冰上温育15 min以利充分裂解, 然后在4 $^{\circ}$ C以20 627 \times g离心15 min。取样品上清液留用, 采用BCA试剂盒(购自上海碧云天生物技术有限公司)进行蛋白定量。进行Western blot检测时, 每个泳道按30 μ g蛋白质样品进行上样, SDS-PAGE电泳分离蛋白, 然后将分离蛋白电转移至硝酸纤维膜(购自美国Millipore公司)上; 5%脱脂牛奶室温封闭1 h后, 以TBST缓冲液洗膜3次, 每次10 min; 然后按要求加入FAK单克隆抗体(1 : 2 500)或抗CANP1/II小亚基抗体(1 : 2 000)室温杂交1~2 h或4 $^{\circ}$ C温育过夜。一抗处理后以TBST洗膜3次后, 再加入相应的辣根过氧化物酶标记二抗(1 : 2 000)室温杂交1 h, PVDF膜以化学发光试剂盒(购自美国Millipore公司)进行显色, 以Syngene Imaging System进行成像, 以Quantity One对蛋白印迹条带进行处理

和分析。

1.7 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件对实验结果进行分析处理。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组内两样本均数比较用 t 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 EtOH诱导MCF-7乳腺癌细胞周期蛋白E和FAK蛋白剪切及细胞迁移

以体积分数为0~0.5%的EtOH刺激模型细胞3 h, 可观察到周期蛋白E和FAK的蛋白剪切呈剂量依赖性; 以体积分数为0.3%EtOH刺激模型细胞0~3 h可观察到时间依赖性蛋白剪切。以体积分数为0.3%的EtOH刺激模型细胞, 可见细胞迁移明显增快(47.3% \pm 4.0%)。以体积分数为0.3%的EtOH刺激对MCF-10A乳腺上皮细胞无明显影响(图1)。

2.2 EtOH诱导的MCF-7细胞周期蛋白E和FAK的蛋白剪切依赖钙蛋白酶

以CANP抑制剂Calpeptin预处理模型细胞1 h, 发现Calpeptin阻断EtOH诱导的周期蛋白E和FAK蛋白剪切; 以EGF(10 ng/mL)刺激模型细胞可引起与EtOH相似的蛋白剪切效应, 而此效应同样可以被Calpeptin所阻断(图2)。

2.3 EGFR介导EtOH诱导的钙蛋白酶依赖性周期蛋白E/FAK蛋白剪切和细胞迁移

以EGFR-I预处理细胞1 h, 再以体积分数为0.3%的EtOH刺激模型细胞3 h, 观察EGFR-I对EtOH诱导的CANP1、周期蛋白E/FAK剪切反应及细胞迁移的影响。结果发现, EGFR-I可明显抑制或阻断EtOH诱导的上述剪切反应, 同时EGFR-I也可明显抑制EtOH诱导的细胞迁移效应(53.0% \pm 4.1%, 图3)。

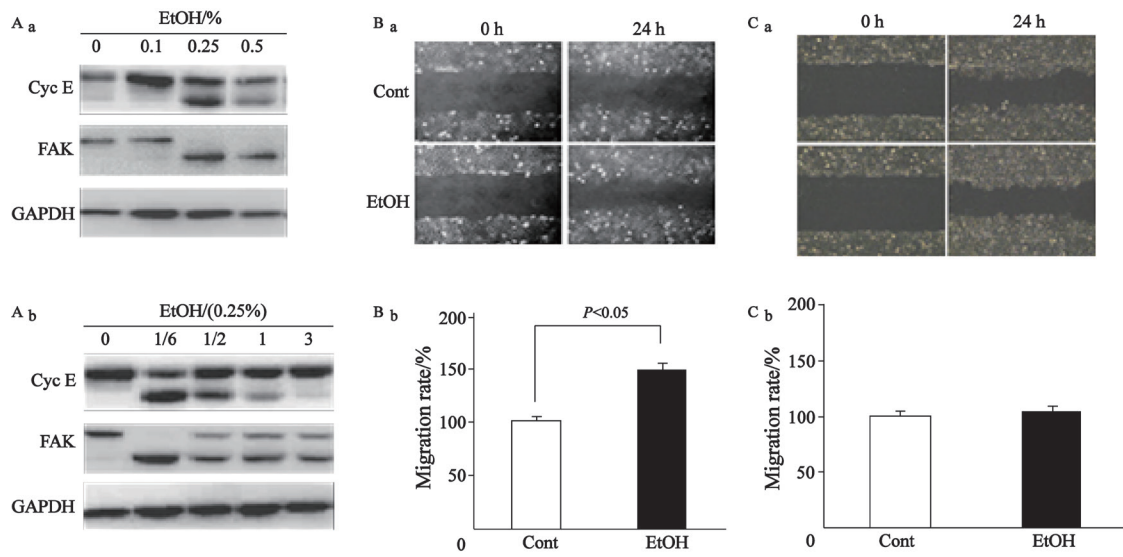


图 1 EtOH诱导MCF-7乳腺癌细胞周期蛋白E和FAK蛋白剪切及细胞迁移

Fig. 1 EtOH stimulated the truncation of cyclin E/FAK and migration in MCF-7 breast cancer cells

A: EtOH induced truncation of cyclin E and FAK in a dose-dependent manner (a) and time-dependent manner (b) in MCF-7 cells; B: EtOH induced significantly enhanced migration in MCF-7 cells; C: EtOH had no impact on migration in MCF-10A cells

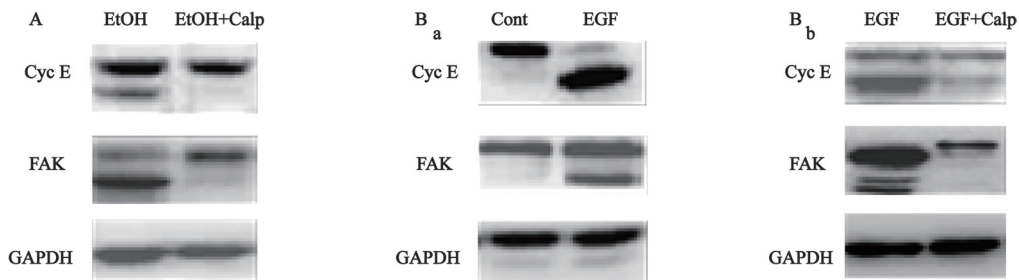


图 2 EtOH或EGF诱导的周期蛋白E和FAK蛋白剪切可被钙蛋白酶抑制剂阻断

Fig. 2 EtOH- or EGF-induced proteolysis of cyclin E/FAK was profoundly reduced by calpain inhibitor, calpeptin

A: Calpeptin suppressed EtOH-induced proteolysis of cyclin E/FAK; B: (a) EGF treatment produced truncated cyclin E and FAK; (b) Calpeptin impeded EtOH-induced proteolysis of cyclin E/FAK

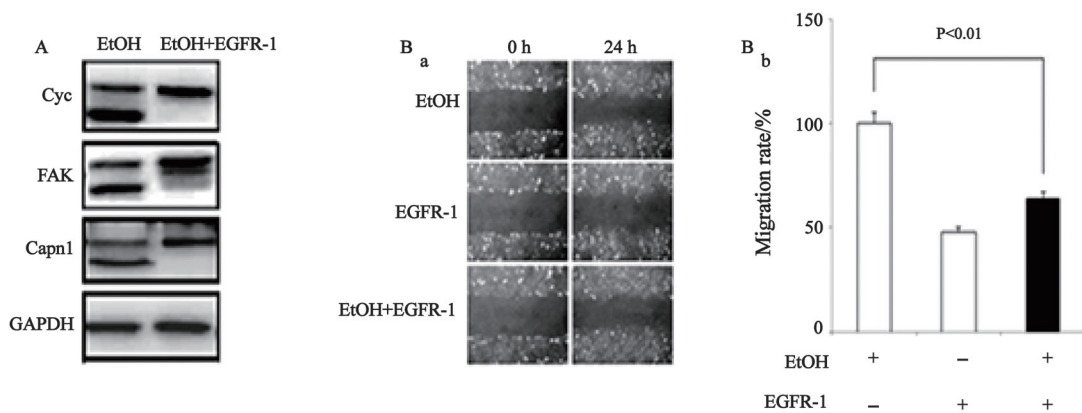


图 3 EGFR-I 对EtOH诱导钙蛋白酶1及周期蛋白E/FAK蛋白剪切和细胞迁移的影响

Fig. 3 Effects of EGFR-I on the proteolysis of calpain1 and cyclin E/FAK and migration induced by EtOH in MCF-7 cells

A: EtOH-induced proteolysis of calpain1 and cyclin E/FAK was significantly suppressed by EGFR-I; B: EGFR-I profoundly inhibited EtOH-stimulated migration in MCF-7 cells. (a: Wound healing; b: Histogram)

3 讨 论

近年来,我国乳腺癌发病率呈快速增高趋势,形势不容乐观^[10]。防止乳腺癌转移是提高患者生存率和生活质量的关键,因而对乳腺癌转移的细胞分子机制进行深入研究具有重要理论和实际意义。现有资料显示,EtOH可通过EGFR诱导乳腺癌细胞发生上皮细胞转化从而促进细胞迁移和侵袭^[2]。EtOH还可通过雌激素及Nm23-ITGA5信号通路促进乳腺癌的发展及肿瘤细胞侵袭行为^[3-4],EtOH促进乳腺癌恶性演进还可能与p38 γ 及巨噬细胞有关^[5-6]。本研究显示,EtOH可刺激MCF-7细胞CANP敏感性底物蛋白分子周期蛋白E和FAK发生剪切形成小分子产物并促进细胞迁移,但EtOH对MCF-10A乳腺上皮细胞迁移无明显影响。CANP依赖性周期蛋白E和FAK与乳腺癌细胞迁移、侵袭和转移有关^[8-9,11],提示EtOH促进乳腺癌细胞迁移可能与胞内CANP活性有关。

本课题组前期研究显示,EtOH可诱导乳腺癌细胞周期蛋白E发生蛋白剪切^[11],提示EtOH的作用可能与胞内CANP有关。Luo等^[12]观察了EtOH对低侵袭性乳腺癌细胞(BT-20、MCF-7及T47D)EGFR家族表达的影响,发现EtOH可上调T47D细胞erbB2、erbB3及erbB4表达并促进细胞迁移。EGFR(erbB1)信号通路在乳腺癌侵袭和转移过程中也具有重要促进作用^[7],但其信号机制尚未完全明确。本研究显示,EGF也可诱导与EtOH相似的周期蛋白E和FAK蛋白剪切效应,而以CANP抑制剂Calpeptin预处理模型细胞,则EGF或EtOH诱导蛋白剪切效应均可被阻断,提示EtOH诱导的周期蛋白E/FAK蛋白剪切与其激活CANP有关,且EtOH和EGF可通过CANP发生串话。以EGFR抑制剂EGFR-I预处理模型细胞,可见EtOH诱导的周期蛋白E/FAK及CANP1大亚基(CANP激活的直接标志^[11])蛋白剪切均可被其阻断,同时EtOH诱导的细胞迁移效应也可被EGFR-I所阻断,说明EtOH诱导MCF-7细胞CANP激活和细胞迁移效应与EGFR

有关。EtOH对雌激素敏感性MCF-10A细胞迁移无明显影响,这可能与正常乳腺上皮细胞内CANP活性较低有关^[13]。

总之,本研究表明EtOH可通过EGFR激活乳腺癌细胞CANP信号活动并促进细胞迁移,而EGFR下游的CANP-周期蛋白E/FAK信号活动可能参与促进乳腺癌细胞迁移和肿瘤转移^[14-15],提示EGFR-CANP信号通路中的关键分子可能成为防治乳腺癌转移的潜在药物靶点,值得深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] FERRARONI M, DECARLI A, FRANCESCHI S, et al. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a multicentre Italian case-control study [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(9): 1403-1409.
- [2] FORSYTH C B, TANG Y, SHAIKH M, et al. Alcohol stimulates activation of Snail, epidermal growth factor receptor signaling, and biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in colon and breast cancer cells [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010, 34(1): 19-31.
- [3] WONG A W, DUNLAP S M, HOLCOMB V B, et al. Alcohol promotes mammary tumor development via the estrogen pathway in estrogen receptor alpha-negative HER2/neu mice [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36(4): 577-587.
- [4] WONG A W, PAULSON Q X, HONG J, et al. Alcohol promotes breast cancer cell invasion by regulating the Nm23-ITGA5 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 75.
- [5] YU K, YANG J, WANG F, et al. Ethanol supports macrophage recruitment and reinforces invasion and migration of Lewis lung carcinoma [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38(10): 2597-2606.
- [6] XU M, WANG S, REN Z, et al. Chronic ethanol exposure enhances the aggressiveness of breast cancer: the role of p38 γ [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 3489-3505.
- [7] JIN W, CHEN B B, LI J Y, et al. TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 50-63.
- [8] LIBERTINI S J, ROBINSON B S, DHILLON N K, et al. Cyclin E both regulates and is regulated by calpain 2, a protease associated with metastatic breast cancer phenotype [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10700-10708.
- [9] LEE W L, SHYUR L F. Deoxyelephantopin impedes mammary adenocarcinoma cell motility by inhibiting calpain-mediated adhesion dynamics and inducing reactive oxygen species and aggresome formation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(8): 1423-1436.
- [10] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾

- 病特征 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569.
- [11] HOU J, WANG X, LI Y, et al. 17beta-estradiol induces both up-regulation and processing of cyclin E in a calpain-dependent manner in MCF-7 breast cancer cells [J]. FEBS Lett, 2012, 586 (6): 892-896.
- [12] LUO J, MILLER M W. Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells in culture [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 63(1): 61-69.
- [13] WANG X D, ROSALES J L, MAGLIOCCO A, et al. Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain [J]. Oncogene, 2003, 22(5): 769-774.
- [14] 刘晓红, 李 铮, 朱筑霞, 等. 氟维司群对乳腺癌细胞迁移及局部黏着斑激酶的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(3): 179-183.
- [15] KONG X, LI G, YUAN Y, et al. MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41523.

(收稿日期: 2016-01-05 修回日期: 2016-03-26)

《中国癌症杂志》2017年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸(随文彩图), 每月30日出版, 单价15元, 全年180元。国际标准连续出版物号1007-3639, 国内统一连续出版物号CN 31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

主 编: 沈镇宙

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 83574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgazzz@163.com

《中国癌症杂志》编辑部