钙蛋白酶 - 周期蛋白 E 介导 EGF 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞迁移能力增强*

陈华妹，李 铮，王旭东，王红梅，秦奕男，朱筑霞**
（贵州医科大学 生理学教研室，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨钙蛋白酶 - 周期蛋白 E（Calpain-CyclinE）信号通路在表皮生长因子（EGF）诱导的乳腺癌细胞迁移中的介导作用。**方法**：取对数生长期 MCF-7 乳腺癌细胞系为模型细胞，采用 EGF、钙离子螯合剂（BAPTA）、钙蛋白酶抑制剂（Calpeptin）及钙蛋白酶抑制剂 I（ALLN）预处理模型细胞，通过伤口愈合实验观察细胞迁移能力，通过蛋白印迹法观察蛋白质剪切及分子量变化，观察 Calpain-CyclinE 信号通路对 EGF 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞迁移能力的影响。**结果**：BAPTA 及 ALLN 能显著阻断 EGF 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞迁移，BAPTA 组与 Con 组相比 $P<0.01$，ALLN 组与 EGF 组相比 $P<0.01$，差异具有统计学意义；Calpeptin 能阻断 EGF 诱导的细胞 Calpain Ⅰ、CyclinE 蛋白剪切。**结论**：Calpain-CyclinE 促进 EGF 诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞的迁移能力加强，可能在乳腺癌的浸润生长中发挥作用。

［关键词］表皮生长因子；钙蛋白酶；周期蛋白 E；乳腺肿瘤；迁移
［中图分类号］R737.9 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2015）12-1344-04

Calpain/Cyclin E Signaling Enhances Epidermal Growth Factor Induced Migration in Breast Cancer Cells

CHEN Huamei, LI Zheng, WANG Xudong, WANG Hongmei, QIN Yinan, ZHU Zhuxia
(*Department of Physiology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the effect of the Calpain/Cyclin E pathways in epidermal growth factor (EGF)-induced migration in MCF-7 breast cancer cells. **Methods**: Using MCF-7 breast cancer cells as a model, EGF, Chelators (BAPTA) and CANP inhibitors (Calpeptin/ALLN) were applied for pretreatment of model cells. Cell migration was determined by wound healing assay. Western blot was used to analyze protein expression changes. The effect of Calpain/CyclinE signaling on EGF-induced migration in breast cancer cells was investigated. **Results**: BAPTA and ALLN could prevent EGF-induced migration of MCF-7 breast cancer, compared between BAPTA group and control group ($P<0.01$), compared between EGF group and ALLN group ($P<0.01$); Calpeptin was able to prevent EGF-induced Cyclin E processing and migration in breast cancer cells. **Conclusion**: Ca^{2+}-Calpain-CyclinE signaling enhances EGF-induced migration in MCF-7 breast cancer cells.

［**Key words**］epidermal growth factor; calpain; cyclin E; breast cancer; migration

表皮生长因子受体（EGFR）过表达是反映乳腺癌预后不良的重要指标之一，在乳腺癌细胞的增殖及分化中发挥着重要作用，EGF 通过 EGFR 诱导细胞内 Ca^{2+} 动员，激活钙蛋白酶（Calpain）及其信号传导活动[1-2]，通过特异性蛋白水解作用调节多种酶和蛋白质的功能。周期蛋白 E 是细胞周期

*［基金项目］黔科合 SY 字［2012］3100 号
**通信作者 E-mail：zhuxia@gmc.edu.cn
网络出版时间：2015-11-16 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151116.2214.004.html

G_1/S 期转换的关键调节分子，参与细胞周期的调节及肿瘤的发生。前期工作显示，17-β 雌二醇（17-β estradiol）可使 Ca^{2+} 动员，从而激活 Calpain，诱导乳腺癌细胞 CyclinE 表达上调，同时生成大量的低分子量 CyclinE（LMW-CyclinE），LMW-CyclinE 的大量生成提示乳腺癌患者预后不良[3-4]。EGF 可诱导乳腺癌细胞增殖，但其在肿瘤细胞迁移和浸润中的作用鲜见报道，Calpain-CyclinE 信号通路是否参与介导 EGF 诱导乳腺癌细胞的迁移目前也尚不清楚。本研究旨在探讨 Calpain-CyclinE 信号通路在 EGF 的诱导下对 MCF-7 人乳腺癌细胞迁移能力的影响，为乳腺癌的临床治疗提供新的治疗靶点。

1　材料与方法

1.1　细胞系及试剂

人乳腺癌细胞系 MCF-7 购自中国科学院昆明细胞库，DMEM 培养基、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。EGF 购自美国 Pefpotech 公司，钙蛋白酶抑制剂 I（ALLN）及钙蛋白酶抑制剂（Calpeptin）购自德国 Calbiochem 公司，钙选择性螯合剂（BAPTA）购自美国 Sigma 公司，抗 CyclinE 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司，抗 Calpain Ⅰ单克隆抗体购自美国 Millipore 公司，抗 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2　方法

1.2.1　MCF-7 细胞培养　细胞常规培养采用 DMEM 高糖培养基，在 37 ℃及 5% CO_2 的条件下培养，待细胞覆盖率达 90% 时进行传代培养。

1.2.2　MCF-7 细胞迁移率　取对数生长期 MCF-7 细胞按每孔 1 mL 接种于 12 孔培养板中，细胞覆盖率达 90% 后，换成无血清 DMEM，用 10 μL 枪头作“Ⅰ”字划痕，用无菌 PBS 洗涤 3 次，换无血清的 DMEM。随机分组，分别加入 0.1% DMSO、10 μmol/L EGF、10 μmol/L EGF＋10 μmol/L BAPTA、10 μmol/L ALLN、10 μmol/L EGF＋10 μmol/L ALLN，置于培养箱内培养，分别于 0 h、12 h、24 h 时在倒置显微镜下拍照。每孔随机取 3 个位点，用 Photoshop 软件标尺测量划痕宽度，测算细胞划痕部位“伤口”宽度，实验重复 3 次。计算细胞迁移率＝[（12 h 或 24 h 时伤口宽度－0 h 时伤口宽度）/0 h 时伤口宽度]×100%。

1.2.3　CalpainⅠ蛋白表达及 CyclinE 蛋白剪切　培养的 MCF-7 细胞覆盖率达 90% 后，将培养基换为无血清 DMEM，加入 10 μmol/L EGF 分别处理 0 h、1 h、6 h、12 h。另取相同覆盖率 MCF-7 细胞，分别加入 0.1% DMSO、10 μmol/L EGF、10 μmol/L Calpeptin、10 μmol/L EGF＋10 μmol/L Calpeptin，24 h 后加入 RIPA 裂解液裂解细胞，4 ℃，14 000 r/min 离心 20 min，取上清液，采用 BCA 法进行蛋白定量。每个泳道按 30 μg 蛋白质样品进行上样，Western blot 检测 Calpain Ⅰ蛋白的表达及 Cyclin E 蛋白剪切。采用自动凝胶成像系统（Syngene 公司）进行成像，GeneSnap 软件分析蛋白印迹结果。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 19.0 处理和分析数据，实验结果以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。组间比较采用单因素方差分析法，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

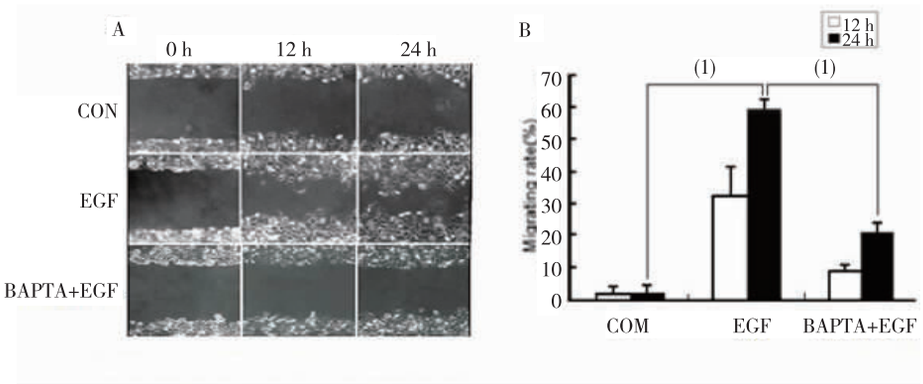
2　结果

2.1　EGF 诱导 MCF-7 细胞迁移

以划痕时距离为 100%，对照组 12 h 和 24 h 时 MCF-7 细胞的迁移率均为 2%，而 EGF 培养 12 h 和 24 h 时 MCF-7 细胞的迁移率分别为 32% 和 60%，与对照组比较差异有统计学意义，$P<0.05$，提示 EGF 可诱导 MCF-7 细胞迁移，BAPTA 预处理细胞后，EGF 诱导的细胞迁移率明显降低（24 h 为 20%），表明 EGF 诱导乳腺癌细胞迁移效应可被 BAPTA 明显抑制，提示 Ca^{2+} 参与 EGF 诱导的细胞迁移活动。见图 1。采用 ALLN 预处理细胞后，EGF 诱导的细胞迁移率仅约 13 %，与 EGF 组比较细胞迁移率明显降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$），提示 Ca^{2+}-Calpain Ⅰ促进 EGF 诱导的乳腺癌细胞迁移活动。见图 2。

2.2　EGF 诱导 MCF-7 乳腺癌细胞 Calpain Ⅰ和 CyclinE 剪切

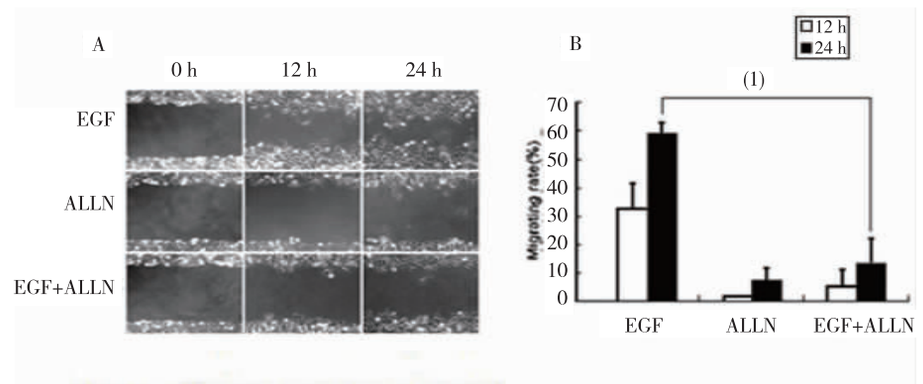
采用 EGF 刺激 MCF-7 乳腺癌细胞，CyclinE 剪切效应在 EGF 作用 1 h 时开始出现并随作用时间增加而加强，12 h 时达到完全剪切，见图 3－A；Calpeptin 预处理细胞后，EGF 诱导的 Calpain1 蛋白剪切和 CyclinE 剪切效应均被抑制，见图 3－B。结果提示，Calpain1 蛋白的剪切活动可促进 EGF 诱导乳腺癌细胞迁移，Calpeptin 通过阻断 Calpain1 的活性而抑制 CyclinE 的剪切效应。



(1)与对照组比较 $P<0.01$

图 1 EGF 及 BAPTA 对 MCF-7 细胞迁移的影响

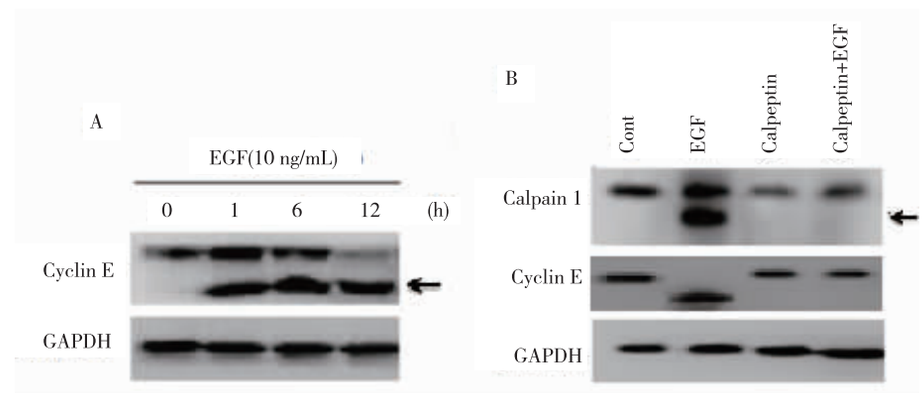
Fig. 1 The effect of EGF and BAPTA on MCF-7 cell migration



(1)与对照组比较 $P<0.01$

图 2 ALLN 对 MCF-7 细胞迁移的影响

Fig. 2 The effect of ALLN on MCF-7 cell migration



注:箭头(⬅)表示蛋白剪切片段

图 3 Calpeptin 对 EGF 诱导的 Calpain1 和 CyclinE 蛋白剪切的影响

Fig. 3 The effect of Calpeptin on Calpain Ⅰ and CyclinE protein expression induced by EGF

3　讨论

目前，乳腺癌高居全球女性恶性肿瘤发病率之首，严重威胁女性健康。在中国，女性乳腺癌每年以 4% 的增长率急剧上升，且发病年龄日趋年轻[5]。肿瘤细胞局部浸润和远处转移是乳腺癌病人死亡的最主要原因。

Calpain 是由 Ca^{2+} 激活的内源性半胱氨酸蛋白酶。在 EGF 介导下参与了肿瘤相关成纤维细胞的激活，从而促进肿瘤细胞的增殖[1-7]。EGF 可促进 Calpain 的表达，诱导其剪切，Calpain 的下游信号分子 CyclinE 也伴随发生蛋白剪切，产生 LMW-CyclinE 片段；Calpain 的裂解可进一步加强 CyclinE 的再表达及 LMW-CyclinE 的大量形成。在多种恶性肿瘤中存在 CyclinE 的失调节而导致出现大量 LMW-CyclinE，提示 LMW-CyclinE 与机体对抗肿瘤药物产生耐药性相关联[8-9]。本实验已证实 BAPTA 通过影响 EGF 对 Ca^{2+} 的激活，进而阻断 Ca^{2+}-Calpain 通路的激活，明显抑制了 EGF 诱导的细胞迁移。结果说明 EGF 的促迁移效应与 Ca^{2+} 信号活动有关[10]。EGF 可诱导 MCF-7 细胞 Calpain Ⅰ的剪切，Calpeptin 能阻断 EGF 的这一效应，提示 Ca^{2+}/Calpain 参与 EGF 诱导的 MCF-7 细胞的迁移。同样的，Calpeptin 可阻断 Calpain-CyclinE 表达及剪切，进一步说明阻断了 Calpain-CyclinE 通路，就可以明显抑制 EGF 诱导的乳腺癌 MCF-7 细胞迁移。

本研究首次发现，Ca^{2+}/Calpain-CyclinE 通路参与介导 EGF 促进乳腺癌细胞的迁移作用，阻断该信号通路有助于抑制乳腺癌细胞的迁移能力，尤其是该条通路中下游分子 CyclinE 有可能成为抑制肿瘤转移的一个潜在的治疗靶点。

4　参考文献

[1] 闫登科，徐晔，董彬，等. 表皮生长因子受体-2 表达与乳腺癌预后的关系[J]. 北京大学学报：医学版，2008(5)：542－543.

[2] Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, et al. Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer, 2014(1): 66－74.

[3] 方仁杏. 细胞周期蛋白 E 的表达对乳腺癌细胞侵袭性及临床预后的影响[D]. 安徽医科大学，2009.

[4] 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. FEBS Lett, 2012(6)：892－896.

[5] Zhang Q, Liu LY, wallg W. The changes in female physical and childbearing characteristicsin china and potential association with risk of breast cancer[J]. BMC Public Health, 2012(12)：368.

[6] 杨莉，朱筑霞，刘晓红，等. 钙蛋白酶在乳腺上皮转化细胞对雌激素刺激反应中的作用[J]. 基础医学与临床，2013(7)：819－823.

[7] 张永华，孙治君. 表皮生长因子受体与乳腺癌的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2011(7)：1454－1456.

[8] Mittendorf EA, Alatrash G, Qiao N, et al. Breast cancer cell uptake of the inflammatory mediator neutrophil elastase triggers an anticancer adaptive immune response[J]. Cancer research, 2012(13)：3153－3162.

[9] 候健美，王旭东，朱筑霞，等. 钙激活中性蛋白酶介导 17β-雌二醇在血清饥饿条件下诱导 MCF-7 乳腺癌细胞周期蛋白 E 蛋白剪切及其对细胞的保护作用[J]. 肿瘤防治，2011(5)：52－53.

[10] Wu CL, Li Y, Zhu ZX, Wang XD, et al. Estradiol Induces Cell Migration and Proteolysis of Focal Adhesion Kinase(FAK) via Calcium/Calpain Signaling in Breast Cancer Cells. Cancer Res on Pre and Tre, 2012(9)：1041－1045.

（2015-08-01 收稿，2015-08-25 修回）
中文编辑：刘　平；英文编辑：周　凌