

PKA 抑制剂在雌激素调控乳腺癌细胞纤连蛋白表达中的作用及机制^{*}

王宏健, 刘晓红, 董宇华, 郭阳, 王旭东^{*}

(贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 观察蛋白激酶 A(PKA)的抑制剂 H89 在雌激素(E₂)依赖人乳腺癌细胞(MCF-7)纤连蛋白(fibronectin, FN)表达及其与 CANP2 的关系。方法: 分别用 E₂ 和 PKA 抑制剂 H89 刺激对数生长期 MCF-7 细胞和 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 模型细胞,采用伤口愈合实验检测细胞迁移率、Western-blot 法测 FN 蛋白的表达。结果: 与对照组比较,H89 预处理后,E₂ 诱导的 MCF-7 细胞迁移率可明显增加,E₂ 与 H89 联用可使 FN 蛋白表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);H89 和 E₂ + H89 组的可促使 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞的迁移率明显降低,并抑制 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞中 FN 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: PKA 抑制剂能明显增强 E₂ 诱导的乳腺癌细胞迁移和 FN 蛋白表达,而该效应可被 CANP2 基因沉默所逆转。

[关键词] 乳腺肿瘤; 雌激素类; 蛋白酶抑制剂; 纤连蛋白类; 细胞迁移; 钙蛋白酶 2

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0792-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.010

The Role and Mechanism of PKA Inhibitors in the Expression of Fibronectin of Estrogen-induced Breast Cancer Cells

WANG Hongjian, LIU Xiaohong, DONG Yuhua, GUO Yang, WANG Xudong

(Department of Physiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact of H89 on the cell migration and the protein expression of fibronectin (FN) in MCF-7 breast cancer cells and its relationship with calpain2. **Methods:** Estrogen (E₂) and protein kinase A (PKA) inhibitor H89 were used to stimulate MCF-7 cells and CANP2-shRNA transfected model cells in logarithmic growth phase respectively. Cell migration and FN protein expression were measured by wound healing test and Western-blot method. **Results:** Compared with the control group, the cell migration rate induced by E₂ increased significantly after H89 pretreatment ($P < 0.05$), and the expression of FN protein increased significantly after E₂ combined with H89 ($P < 0.01$). After gene silencing of calcium-activated neutral protease 2 (CANP2), the cell migration of H89 group and E₂ + H89 group decreased significantly ($P < 0.01$), and the up-regulation of FN protein in H89 group and E₂ + H89 group was significantly inhibited ($P < 0.01$ compared with NC group). **Conclusion:** PKA inhibitors can significantly enhance E₂-induced cell migration and FN protein expression in breast cancer cells, which can be reversed by CANP2 gene silencing.

[Key words] breast neoplasms; estrogen; protease inhibitors; fibronectin; cell migration; calpain 2

^{*}[基金项目] 贵州省科技厅 - 贵州医科大学科技合作计划项目[黔科合 LH(2015)7317]; 国家自然科学基金项目(31360252, 31660345)

^{**} 通信作者 E-mail:1157102188@qq.com

网络出版时间:2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0039.010.html>

calpain 2 乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,其中约 70% 为雌激素(Estrogen, E_2)依赖性^[1]。 E_2 不仅在女性生殖系统和乳腺生长发育等生理功能调节中发挥重要作用,在异常情况下, E_2 也是促进乳腺癌恶性进展的重要因素^[2-4]。 E_2 可以使乳腺癌细胞内环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)增多,从而激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),激活的 cAMP/ PKA 途径可抑制乳腺癌细胞的迁移^[5-8]。有研究显示,纤连蛋白(fibronectin, FN)的表达促进乳腺癌细胞的恶性行为^[9],其机制尚未完全阐明。钙激活中性蛋白酶(calculin-activated neutral protease, CANP)属于 Ca^{2+} 依赖性的半胱氨酸蛋白酶水解家族,据报道其活性在乳腺癌异常增高^[10]。然而,关于 PKA 是否通过 CANP 参与调控 E_2 信号分子机制,目前尚未完全阐明。本研究以 MCF-7 细胞和 CANP2-shRNA 转染细胞为模型细胞,采用伤口愈合实验和蛋白免疫印迹实验等方法,观察 PKA 抑制剂对 E_2 诱导乳腺癌细胞的迁移和 FN 蛋白表达的影响,同时观察其与 CANP 的关系,为研究 E_2 促进乳腺癌恶性进展的机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 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、胰蛋白酶及青霉素/链霉素均购自美国 HyClone 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司。

1.1.2 抗体及重要试剂 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E_2) 购于 Sigma 公司、H89(PKA 抑制剂)购自碧云天生物技术公司,抗 FN、calpain2 单克隆抗体,抗 GAPDH 抗体由 Santa cruz 公司购买,羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体购自武汉博士德公司,CANP2-shRNA 设计、合成和构建由上海吉玛制药有限公司提供。

1.2 人乳腺癌 MCF-7 细胞

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF-7 采用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS、1% 青霉素及 1% 链霉素),在 37℃ 及 5% CO_2 条件下常规培养,待细胞满度达 90% 时进行传代培养。

1.2.2 细胞划痕实验 取对数生长期 MCF-7 细胞混悬液按每孔 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 μ L 枪

头作“1”字划痕,用无菌 PBS 洗涤 3 次,换无血清的 DMEM,随机分为 4 组,分别加入 0.1% DMSO(对照组)、10 nmol/L(E_2 组)、10 mg/L(H89 组)、10 nmol/L E_2 + 10 mg/L H89(E_2 + H89 联合组)处理,置于培养箱内培养。分别于 0、12 及 24 h 时用倒置显微镜下拍照。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 = [(0 h 伤口宽度 - 12 或 24 h 伤口宽度)/0 h 伤口宽度] \times 100%。

1.2.3 Western blot 检测 FN 蛋白表达 培养 MCF-7 细胞满度达 50% ~ 60% 后,将培养基换为无血清 DMEM,同时将细胞分为对照组(0.1% DMSO)、 E_2 组(10 nmol/L E_2)、H89 组(10 mg/L)及 E_2 + H89 组(10 nmol/L E_2 + 10mg/L H89)。药物作用 48 h 后,加入 RIPA 裂解液裂解细胞。4℃, 12 000 r/min 离心 20 min 后取样品上清液留用,采用 BCA 法进行蛋白定量。每个泳道按 30 μ g 蛋白质样品进行上样,按照 Western blot 实验,采用自动凝胶成像系统(Syngene 公司)成像, GeneSnap 软件分析蛋白印迹结果。

1.3 CANP2-shRNA 转染人乳腺癌 MCF-7 细胞

1.3.1 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞与稳定表达细胞株的筛选 按照说明书要求进行 CANP2-shRNA 转染并且筛选出稳定表达的细胞株,待细胞达到检测所需满度时,使用荧光显微镜观察并且通过 Western blot 检测转染效率,获得稳定表达的细胞株后继续在 CO_2 培养箱中 37℃ 温育 24 ~ 48 h 后,用嘌呤霉素处理筛选出稳定表达的细胞株。同时转染与 CANP2 无同源性的序列作为阴性对照组(NC 组)。

1.3.2 细胞划痕实验 取对数生长期 CANP2-shRNA 稳定表达细胞株的 MCF-7 细胞株和 NC(negative control)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 μ L 枪头作“1”字划痕,用无菌 PBS 洗涤 3 次,换无血清的 DMEM,均随机分为 4 组,分别为对照组、 E_2 组、H89 组及 E_2 与 H89 联合组,其余处理同 1.2.2。

1.3.3 Western blot 检测 FN 蛋白表达 培养的 CANP2-shRNA 稳定表达细胞株 MCF-7 细胞和 NC 细胞覆盖率达 50% ~ 60% 后,将培养基换为无血清 DMEM,同时将细胞分为对照组(0.1% DMSO)、 E_2 组(10 nmol/L E_2)、H89 组(10 mg/L)及 E_2 +

H89 组(10 nmol/L E₂ + 10 mg/L H89),其余处理同 1. 2. 3。

1. 4 统计学处理

采用软件 prism 6. 2 处理和分析数据,实验结果以均数 ± 标准差表示。组间比较采用单因素方法 one-way ANOVA 进行分析,*P* < 0. 05 表示差异有统计学意义。

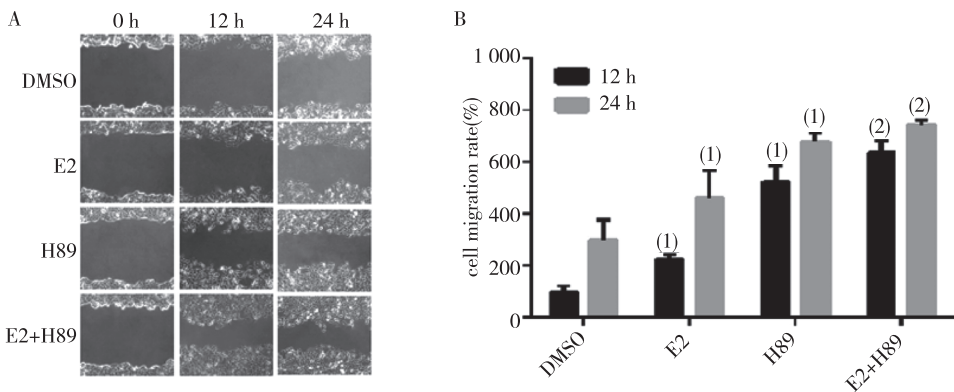
2 结果

2. 1 H89 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的作用

2. 1. 1 H89 增强 E₂ 诱导的人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移效应 与对照组比较,E₂ 可明显增加 MCF-7 细胞的 12 h 和 24 h 时的迁移率,分别增加 (14. 30 ± 0. 62)% 和 (28. 74 ± 3. 89)% ,差异有统

计学意义 (*P* < 0. 05)。H89 组 MCF-7 细胞 24 h 时,可促进 MCF-7 细胞的迁移,与对照组比较,迁移率增加了 (20. 41 ± 1. 46)% ,差异有统计学意义 (*P* < 0. 05)。H89 与 E₂ 组 MCF-7 细胞作用 24 h 后,细胞的迁移率增加了 (31. 71 ± 2. 13)% 。与 E₂ 组比较,H89 与 E₂ 联合作用后,MCF-7 细胞的 12 h 和 24 h 的迁移率均明显增加,差异有统计学意义 (*P* < 0. 05)。见图 1。

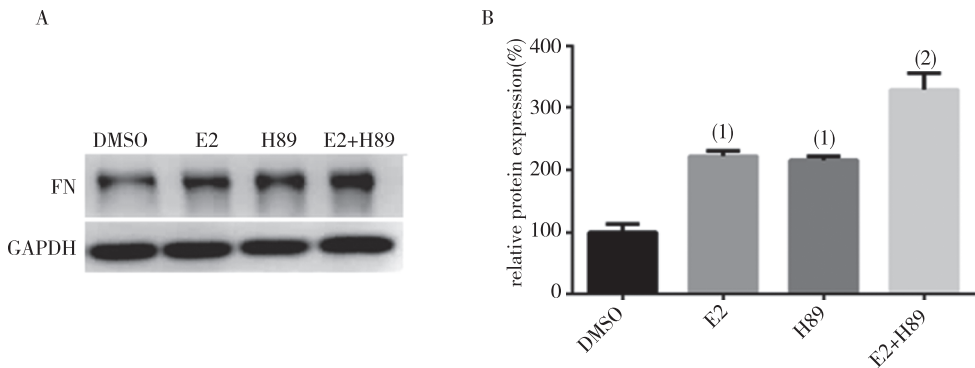
2. 1. 2 H89 增加 E2 诱导的 MCF-7 细胞 FN 蛋白表达 与对照组比较,E₂ 组 FN 蛋白表达增加 (121. 9 ± 9. 342)% ;H89 FN 蛋白的表达增加 (115. 4 ± 8. 89)% ,差异有统计学意义 (*P* < 0. 01) ;与 E₂ 组比较,H89 + E₂ 组 MCF-7 细胞 FN 蛋白表达增加 (105. 9 ± 15. 9)% ,差异有统计学意义 (*P* < 0. 01)。见图 2。



⁽¹⁾与对照组比较, *P* < 0. 05 ;⁽²⁾与 E₂ 组比较, *P* < 0. 05

图 1 H89 对 E2 诱导的 MCF-7 细胞迁移的影响

Fig. 1 Effect of H89 on E2-induced migration of MCF-7 cells



⁽¹⁾与对照组比较, *P* < 0. 01 ;⁽²⁾与 E₂ 组比较, *P* < 0. 01

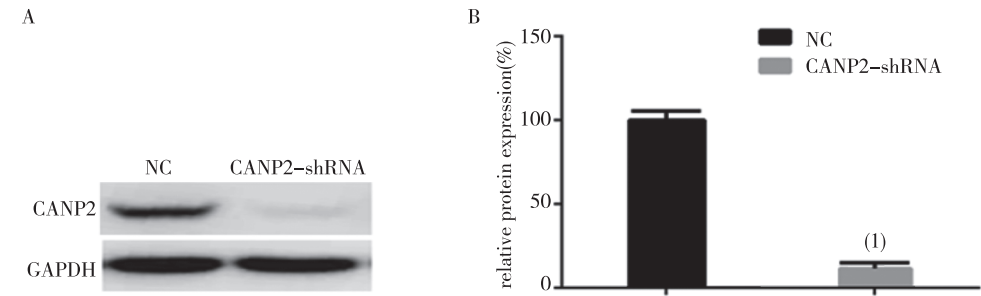
图 2 H89 对 MCF-7 细胞纤连蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of H89 treatment on the expression of FN in MCF-7

2.2 H89 对 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞的作用

2.2.1 CANP2-shRNA 转染后 MCF-7 细胞中 CANP2 蛋白表达 与 NC 组比较,CANP2-shRNA

转染 MCF-7 乳腺癌细胞组 CANP2 蛋白表达量降低了(88.47 ± 7.07)%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。结果提示沉默 CANP2 基因后,筛选的稳定表达细胞株满足实验要求。



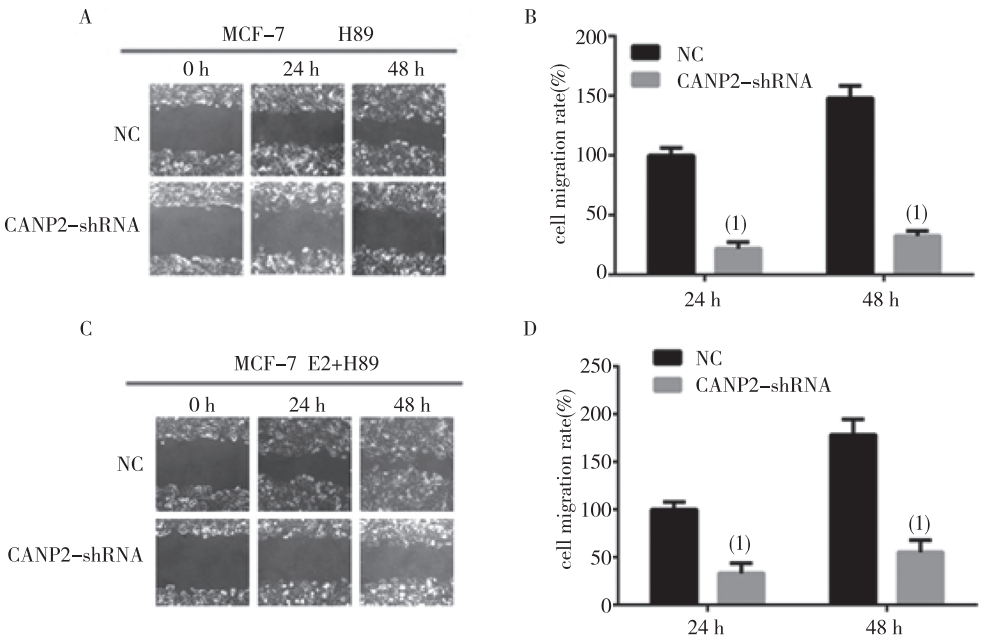
(1) 与对照组比较, $P < 0.01$

图 3 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞 CANP2 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of CANP2 protein in CANP2-shRNA transfected cells

2.2.2 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞中,H89 的促细胞迁移效应 H89 组明显降低 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞的迁移率,见图 4A;与 NC 组比较,H89 组 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞迁移率 24 h 和 48 h 时分别降低了(66.67 ± 9.67)% 和 (123.04 ± 20.54)%,差异有统计学意义($P <$

0.01),见图 4B。基因沉默 CANP2 后,与 NC 组比较, $E_2 + H89$ 联合组 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞的迁移率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4C。 $E_2 + H89$ 组细胞迁移率 24 和 48 h 的细胞迁移率分别降低(78.12 ± 6.12)% 和 (115.35 ± 12.09)%,见图 4D。



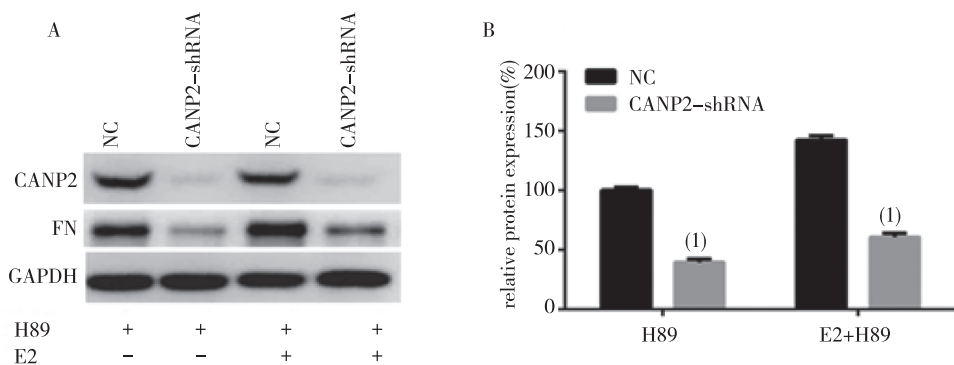
(1) 与对照组比较, $P < 0.01$

图 4 基因沉默 CANP2 逆转 H89 的促细胞迁移的影响

Fig. 4 Transfection of shRNA CANP2 reversing the effect of H89 on cell migration

2.2.3 H89 抑制 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞中 FN 蛋白表达 H89 单独作用于 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞,与 NC 组比较, FN 蛋白的表达明显减少,相对蛋白表达量减少 ($60.52 \pm 4.99\%$),

差异有统计学意义 ($P < 0.01$); H89 与 E2 联合使用时,与 NC 组比较, CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞的 FN 蛋白表达减少 ($81.75 \pm 4.26\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.01$

图 5 H89 对 CANP2-shRNA 转染 MCF-7 细胞 FN 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of H89 on the expression of fibronectin in cell line of CANP2 gene silencing

3 讨论

近年来,乳腺癌的早期诊断和临床治疗取得了较大进展,但绝大多数病人仍死于肿瘤的转移。大量研究表明,作为体内主要的性激素, E2 能刺激乳腺肿瘤的生长并促进其转移和侵袭^[11],但其具体作用机制尚未完全阐明。cAMP/PKA 通路是一条经典的由 G 蛋白偶联受体介导的细胞信号传导通路,参与细胞的增殖、分化及凋亡、离子转运、调节新陈代谢及基因转录相关^[12-13]。Filardo 等人^[14]的研究显示,在 MCF-7 和 SKBR3 细胞中, E2 可以快速激活膜结合的腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC),进而在数分钟内即引起细胞内 cAMP 浓度增高,并激活 PKA,继而引起细胞功能的改变。因此,阐明 E2-PKA 下游信号通路,有助于加深对 E2 促癌效应分子机制的认识。Clarysse 等^[15]报道,激活 cAMP-PKA 途径能降低人乳腺癌 MDA-MB-435s 的细胞迁移率。Lee 等^[16]的研究表明, cAMP-PKA 也能调控宫颈癌细胞的迁移。在本研究中结果亦显示单独使用 H89 能够增加细胞的迁移率。本研究发现, PKA 选择性抑制剂 H89 可明显增强 E2 的促细胞迁移效应,提示 cAMP/PKA 途径对 E2 促细胞迁移效应可能具有负性调控作用。国内外均有研究显示,肿瘤中 FN 表达增加和表型改变可促进肿瘤的增殖,迁移和侵袭;而且还可以

限制肿瘤细胞对治疗的反应性^[17-18]。同时本课题组的前期研究显示 E2 可通过上调 FN 来促进 MCF-7 和 MDA-MB-468 乳腺癌细胞的迁移^[19]。而本研究结果显示 H89 能够显著增强 E2 对 MCF-7 细胞纤连蛋白 FN 表达的上调作用,表明 cAMP/PKA 途径对 E2 的抑制效应可能也与纤连蛋白 FN 表达有关。有研究显示, cAMP/PKA 可通过 CANP 而调控细胞迁移活动^[20]。本课题组亦曾报道, CANP 抑制剂 Calpeptin (Calp) 能明显抑制 E2 诱导的 FN 蛋白上调^[19],但 Calp 对 CANP1 和 CANP2 均有抑制效应,不能明确何种 CANP 亚型参与对 FN 的上调作用。

为进一步查明 E2-PKA 下游是否通过 CANP2 分子来影响乳腺癌细胞的迁移及 FN 表达,本研究采用 CANP2-shRNA 转染模型细胞并筛选稳定表达细胞株。结果发现,基因沉默 CANP2 后, H89 对 E2 促细胞迁移效应的上调作用受到明显抑制。同时,基因沉默 CANP2 后, H89 对 E2 诱导的 FN 蛋白表达上调的作用也被逆转。这些结果提示, PKA 通过 CANP2-FN 通路对 E2 促癌效应发挥重要的负性调控作用。表明 E2 诱导乳腺癌细胞 FN 蛋白表达和细胞迁移与 PKA-CANP2 通路有关。

4 参考文献

[1] AKRAM M, IQBAL M, DANIYAL M, et al. Awareness

- p>and current knowledge of breast cancer[J].
- Biol Res*
- , 2017,50(1):33.
- [2] PUPO M, PISANO A, LAPPANO R, et al. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts[J]. *Environ Health Perspect*, 2012,120(8):1177–1182.
- [3] SAMPSON J N, FALK R T, SCHAIRER C et al. Association of estrogen metabolism with breast cancer risk in different cohorts of postmenopausal women[J]. *Cancer Res*, 2017,77(4):918–925.
- [4] YU C L, SE L K, YOUNG R P, et al. Parthenolide promotes apoptotic cell death and inhibits the migration and invasion of SW620 cells[J]. *Intest Res*, 2017,15(2):174–181.
- [5] YU L L, YUAN D Z, ZHANG S M, et al. Progress of non-genomic action of estrogen and its impact on female reproduction[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2016,68(4):547–556.
- [6] LAU K M, MA F M, XIA J T, et al. Activation of GPR30 stimulates GTP-binding of Gαi1 protein to sustain activation of Erk1/2 in inhibition of prostate cancer cell growth and modulates metastatic properties[J]. *Experimental Cell Research*, 2017,350(1):199–209.
- [7] YU X, STALLONE J N, HEAPS C L, et al. The activation of G protein-coupled estrogen receptor induces relaxation via cAMP as well as potentiates contraction via EGFR transactivation in porcine coronary arteries[J]. *PLoS One*, 2018,13(1):e0191418.
- [8] WANG J P, HIELSCHER A. Fibronectin: How its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting[J]. *Journal of Cancer*, 2017,8(4):674–682.
- [9] JEONG Y, YOU D, KANG H G, et al. Berberine suppresses fibronectin expression through inhibition of c-Jun phosphorylation in breast cancer cells[J]. *J Breast Cancer*, 2018,21(1):21–27.
- [10] 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.
- [11] RIDLEY A J, SCHWARTZ M A, BURRIDGE K, et al. cell migration: integrating signals from front to back[J]. *Science*, 2003,302(5651):1704–1709.
- [12] VELLOSO F J, BIANCO A F, FARIAS J O, et al. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways[J]. *Onco Targets and Therapy*, 2017,10:5491–5524.
- [13] 任伟宏. 蛋白激酶与细胞凋亡信号及凋亡抑制信号的转导[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2004,25(1):79–82.
- [14] FILARDO E J, QUINN J A, FRACKELTON A R J, et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis[J]. *Mol Endocrinol*, 2002,16(1):70–84.
- [15] CLARYSSE L, GUÉGUINOU M, POTIER-CARTEREAU M, et al. cAMP-PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca²⁺ entry and cancer cell migration by regulation of SK3-Orai1 complex[J]. *Pflugers Arch*, 2014,466(10):1921–1932.
- [16] LEE J W, LEE J, MOON E Y. HeLa human cervical cancer cell migration is inhibited by treatment with dibutyryl-cAMP[J]. *Anticancer Res*, 2014,34(7):3447–3455.
- [17] KENNY H A, CHIANG C Y, WHITE E A, et al. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014,124(10):4614–4628.
- [18] EKE I, STORCH K, KRAUSE M, et al. Cetuximab attenuates its cytotoxic and radiosensitizing potential by inducing fibronectin biosynthesis[J]. *Cancer Research*, 2013,73(19):5869–5879.
- [19] 于庆龙, 张莹, 王宏健, 等. 17β-雌二醇对乳腺癌细胞迁移的影响及 CANP-FN 通路的介导作用[J]. *中国药理学通报*, 2017,33(10):1371–1376.
- [20] WU Q, DHIR R, WELLS A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion[J]. *Mol Cancer*, 2012,11(1):3.
- (2019-04-15 收稿, 2019-07-03 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 丁廷森