

# EGF对三阴乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响及CANP-YAP通路的介导作用\*

张莹, 金爱, 王旭东\*\*

(贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨上皮生长因子(EGF)对人三阴乳腺癌(TNBC)细胞迁移、侵袭能力的影响及CANP-YAP的介导作用。方法: 以人源乳腺癌细胞系MDA-MB-231和468细胞为模型细胞, 实验分为磷酸盐缓冲液(PBS)组、EGF组、EGF联合钙蛋白酶抑制剂(Cal)组(EGF联合Cal)及EGF联合钙蛋白酶抑制剂Ⅲ(CIⅢ)组(EGF联合CIⅢ), 采用伤口愈合实验检测细胞迁移能力、Transwell检测细胞侵袭能力及Western blot法检测YAP蛋白在细胞中的表达水平。结果: 伤口愈合实验和Transwell实验结果显示, EGF组MDA-MB-231、468细胞的迁移率和侵袭率均高于PBS组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), EGF联合Cal组和EGF联合CIⅢ组中MDA-MB-231、468细胞的迁移率和侵袭率均低于EGF组( $P < 0.05$ ); Western blot实验结果显示, EGF组MDA-MB-231细胞和MDA-MB-468细胞中YAP蛋白表达均高于PBS组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); EGF联合Cal组和EGF联合CIⅢ组中MDA-MB-231、468细胞YAP蛋白表达均低于EGF组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: EGF具有诱导TNBC细胞MDA-MB-231、468细胞迁移和侵袭, Cal和CIⅢ可以阻断EGF的上述生物学效应, EGF可能通过CANP-YAP信号通路促进肿瘤细胞的恶性生物学行为。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 细胞迁移; 上皮生长因子; 钙蛋白酶; YES相关蛋白

**[中图分类号]** R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)01-0023-06

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.01.005

## Effect of EGF on Migration and Invasion of Triple Negative Breast Cancer Cells and Mediation of CANP-YAP Pathway

ZHANG Ying, JIN Ai, WANG Xudong

(Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of epithelial growth factor (EGF) on the migration and invasion of human triple negative breast cancer (TNBC) cells and the mediation of CANP-YAP pathway. **Methods:** Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 were used as model cells, which were divided into the phosphate buffer (PBS) group, EGF group, EGF combined with calpeptin (Cal) group, and EGF combined with calpain inhibitor (CI) III group. The migration ability of the cells was measured by wound healing test. Transwell was used to detect the invasive ability of the cells, and Western blot was used to detect the expression level of target protein in cells. **Results:** The migration rate of MDA-MB-231 and -468 cells in EGF group was higher than that in PBS group ( $P < 0.05$ ), and the invasion rate of the two kinds of cells in EGF group was higher than that in PBS group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); The YAP protein expression of the two kinds of cells in EGF group was higher than that in PBS group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); The migration rate of the two kinds of cells in EGF combined with Cal group and EGF combined with CI III group was lower than that in EGF group ( $P < 0.05$ ). The invasion rate of the two kinds of cells in EGF combined Cal group and EGF combined CI III group was lower than that in EGF group ( $P < 0.05$ ), and the expression of YAP

\*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660345, 31360252)

\*\*通信作者 E-mail: 1157102188@qq.com

网络出版时间: 2020-01-09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20200109.2011.005.html>

protein in EGF combined Cal group and EGF combined CI III group was higher than that in EGF group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** EGF has the ability to induce migration and invasion of model cells. Cal and CI III can block the above biological effects induced by EGF, suggesting that EGF can promote malignant biological behavior of cancer cells through CANP-YAP signaling pathway.

[**Key words**] triple negative breast cancer; cell migration; epithelial growth factor; calpain; YES associated protein

三阴乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)主要特征是  $\alpha$ -雌激素、黄体酮和人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 表现均为阴性, 具有内脏转移及脑转移发生率高、肿瘤侵袭能力远远大于非 TNBC 的特点, 因此 TNBC 患者存活率和无病生存率更低, 严重危害全世界女性的生命健康<sup>[1-3]</sup>。肿瘤细胞的迁移、侵袭、促血管新生等是肿瘤发生发展, 甚至是恶性增殖的重要原因<sup>[4-6]</sup>。因此, 正确预防肿瘤细胞的恶性行为学效应, 是提升乳腺癌患者存活率的重要措施<sup>[7-8]</sup>。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是由 53 个氨基酸残基组成的低分子肽链, 能诱导肿瘤细胞侵袭活动、与多种癌症患者的预后密切相关, 如肝癌、胃癌及乳腺癌等<sup>[9-10]</sup>。钙激活中性蛋白酶 (calcium-activated neutral protease, CANP) 是一种降解蛋白的酶, 其活性易受到肌肉中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响<sup>[11]</sup>。有报道认为, EGF 通过 CANP 介导多种癌症细胞的周期蛋白水解及癌细胞迁移<sup>[12]</sup>。Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是 Hippo 信号传导途径的主要下游因子, 参与器官生长及组织修复, 在癌症中被广泛激活, YAP 的过表达可以刺激肿瘤的发生和转移<sup>[13-15]</sup>。然而 EGF 促进 TNBC 细胞迁移、侵袭是否与 CANP-YAP 信号通路有关, 目前未见报道。因此, 本研究通过细胞分子生物学手段, 探讨 EGF 对 TNBC 细胞迁移、侵袭的生物学行为及 CANP-YAP 信号通路的介导作用, 力图为探寻 TNBC 的临床有效治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和试剂

人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院昆明细胞库, 人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 细胞购自中国科学院上海细胞库, EGF 购自美国 PeproTech 公司, 钙蛋白酶抑制剂 (calpeptin, Cal) 和钙蛋白酶抑制剂 III (calpain inhibitor III,

CI III) 购自美国 Sigma 公司, YAP 抗体购自美国 CST 公司, 蛋白内参 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司, BCA (bicinchoninic acid) 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo scientific 公司, 全细胞裂解液 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA)、蛋白酶抑制剂 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、磷酸酶抑制剂和多种蛋白酶抑制剂购自中国 BOSTER 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** MDA-MB-231、MDA-MB-468 乳腺癌细胞培养在 Leibovitz's L-15 培养基、10% 血清和 1% 青霉素 - 链霉素中, 于 37 °C 无菌不接触  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度环境下培养。

**1.2.2 实验分组** 根据不同的实验需求分为 4 组, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 组加入 1% PBS 处理细胞, EGF 组用 10 nmol/L EGF 处理细胞, EGF 联合 Cal 组用 10  $\mu\text{mol/L}$  Cal 预处理细胞 2 h 后加入 10 nmol/L EGF 处理细胞, EGF 联合 CI III 组用 10  $\mu\text{mol/L}$  CI III 预处理细胞 2 h 后加入 10 nmol/L EGF 处理细胞。

**1.2.3 伤口愈合实验** 将所需细胞接种于 12 孔板, 正常培养细胞生长到 90% 以上后, 采用 200  $\mu\text{L}$  黄色枪头轻轻地在培养板底部划一个十字, 形成无细胞区域, 然后用 PBS 清洗 1 ~ 2 次去除漂浮细胞; 按照实验设计加入药物刺激, 选取 0 h 和 24 h 时间点拍照, 测量计算划痕宽度, 并计算细胞迁移率 [24 h 细胞迁移率 (%) = 实验组 (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 对照组 (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度)  $\times 100\%$ ], 最后将对照组设为 100%, 数据以条图表示。

**1.2.4 Transwell 小室实验** Matrigel 胶 (美国 Becton Dickinson 公司) 冰上融化后用无血清培养基按 1:8 稀释; 吸取稀释好的 Matrigel 胶 100  $\mu\text{L}$  于 Transwell 小室 (美国 Millipore 公司), 放于细胞培养箱 1 ~ 3 h 待完全凝固; 用不含血清的培养基混

匀预先处理好的细胞,取 200  $\mu\text{L}$  含有  $1.5 \times 10^5$  个细胞的培养基加到小室,下室加入 700  $\mu\text{L}$  含有 20% 血清的培养基;细胞培养箱培养 24 h,4% 甲醛固定 15 min,0.1% 结晶紫溶液染色 15 min,棉签擦掉小室内细胞;显微镜 10 倍放大观察,随机取 4 个视野拍照计数,完全独立实验重复 3 次后统计处理结果。

**1.2.5 Western blot 实验** 培养细胞到生长对数周期,对细胞进行不同处理,利用新鲜配置的细胞裂解液(RIPA 中加入 PMSF、磷酸酶抑制剂、多种蛋白酶抑制剂,使其终浓度为 1 mmol/L),提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度;上样蛋白样品 30  $\mu\text{g}$ ,用 10% PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)、5% 脱脂奶粉(中国伊利)封闭 1~2 h,加入稀释好的抗体 YAP(1:1 000)、GAPDH(1:10 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  摇晃过夜;吐温-20-三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween-20, TBST)洗膜 3 次、10 min/次,加入相应的二抗(1:4 000),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次、10 min/次;化学发光剂(美国

Millipore 公司)对蛋白进行曝光显色,Syngene Imaging 系统进行成像,条带灰度处理分析目的蛋白表达量[目的蛋白表达量 = 目的条带的(optical density, OD)值/内参 OD 值  $\times 100\%$ ]分析。实验重复 3 次后统计处理结果。

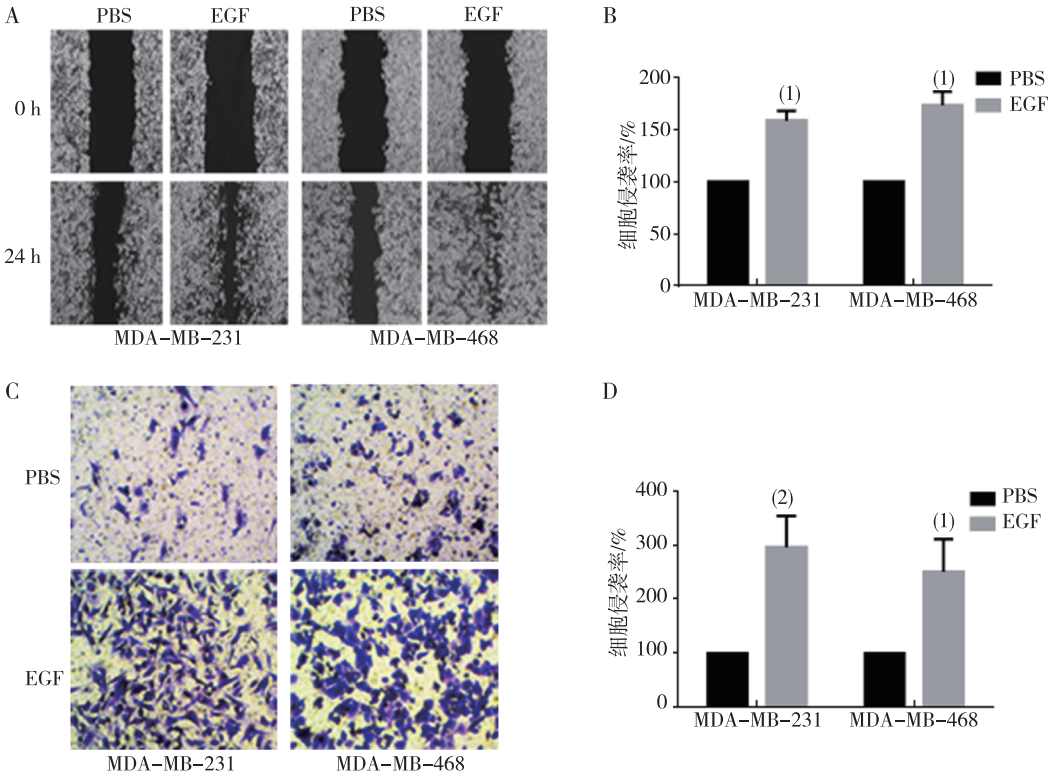
1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行分析处理。正态分布数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组样本比较采用单因素方差分析,组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGF 对 TNBC 细胞迁移和侵袭的影响

伤口愈合实验结果显示,EGF 组人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、468 细胞的迁移率均高于 PBS 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1A、1B;Transwell 小室实验结果显示,EGF 组人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、468 细胞的侵袭率均高于 PBS 组,且差异均有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),见图 1C、1D。



注:A 为伤口愈合实验,B 为伤口愈合实验的条图,C 为处理 24 h 时的 Transwell 实验,D 为处理 24 h 时的 Transwell 小室实验的条图;与 PBS 组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$ 。

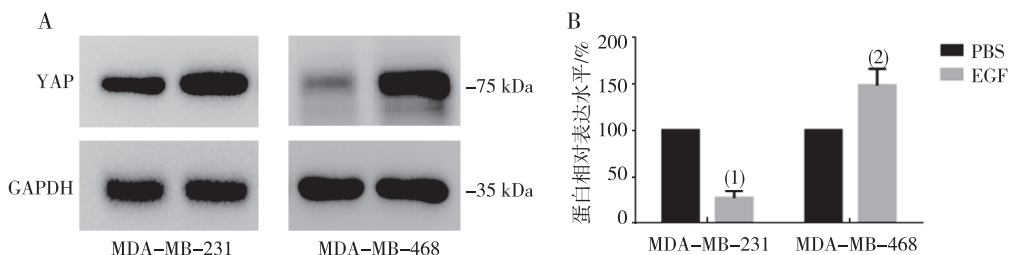
图 1 EGF 对 MDA-MB-231、468 细胞迁移率和侵袭率的影响

Fig. 1 Effects of EGF on mobility and invasion of MDA-MB-231 and 468 cells

## 2.2 EGF 对 TNBC 细胞 YAP 表达的影响

Western blot 实验结果显示,EGF 组人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 YAP 蛋白表达低于 PBS 组,

差异有统计学意义( $P < 0.05$ );EGF 组人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 YAP 蛋白表达明显高于 PBS 组,差异有高度统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 2。



注:A 为 Western blot 实验,B 为 Western blot 实验的条图;与 PBS 组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$ 。

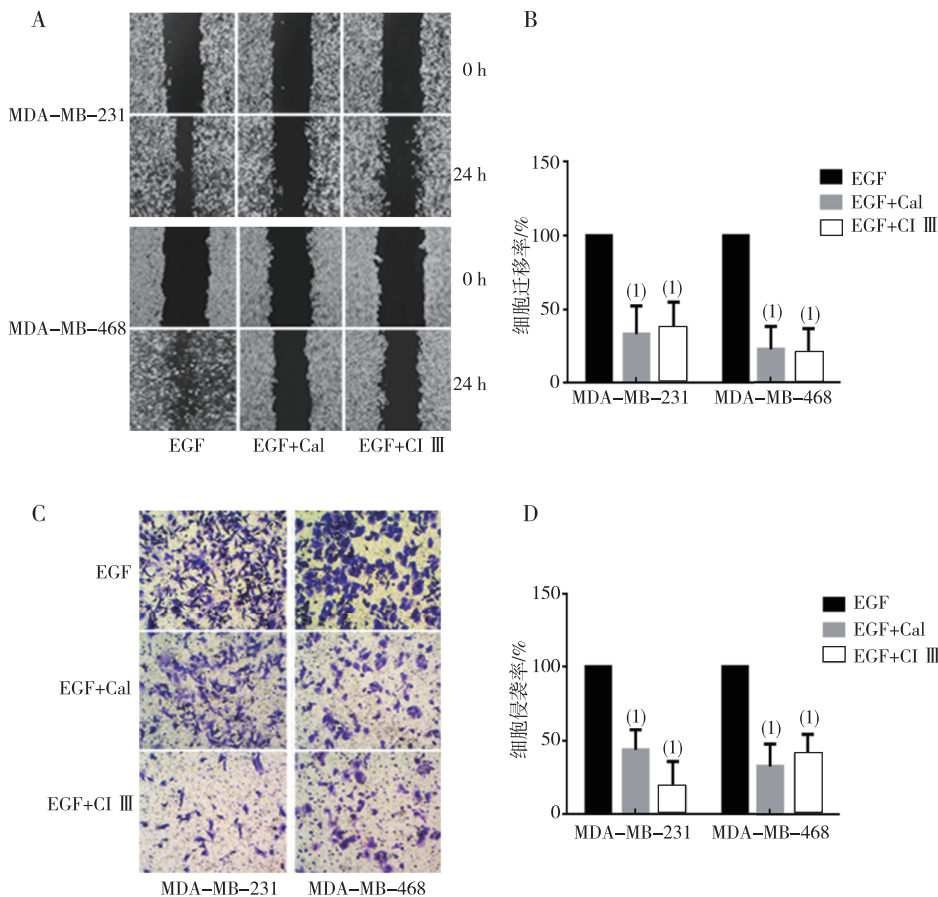
图 2 EGF 对 MDA-MB-231、468 细胞 YAP 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of EGF on YAP protein expression of MDA-MB-231 and 468 cells

## 2.3 CANP 抑制剂对 EGF 诱导的乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

伤口愈合实验结果显示,EGF 联合 Cal 组和 EGF 联合 CI Ⅲ组中 MDA-MB-231、468 细胞的迁

移率均低于 EGF 组( $P < 0.05$ ),见图 3A、3B;Transwell 实验结果显示,EGF 联合 Cal 组和 EGF 联合 CI Ⅲ组中 MDA-MB-231、468 细胞的侵袭率均低于 EGF 组( $P < 0.05$ ),见图 3C、3D。



注:A 为伤口愈合实验,B 为伤口愈合实验的条图,C 为处理 24 h 时的 Transwell 实验,

D 为处理 24 h 时的 Transwell 实验的条图;<sup>(1)</sup>与 EGF 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 CANP 抑制剂对 EGF 诱导 MDA-MB-231、468 细胞迁移和侵袭能力的影响

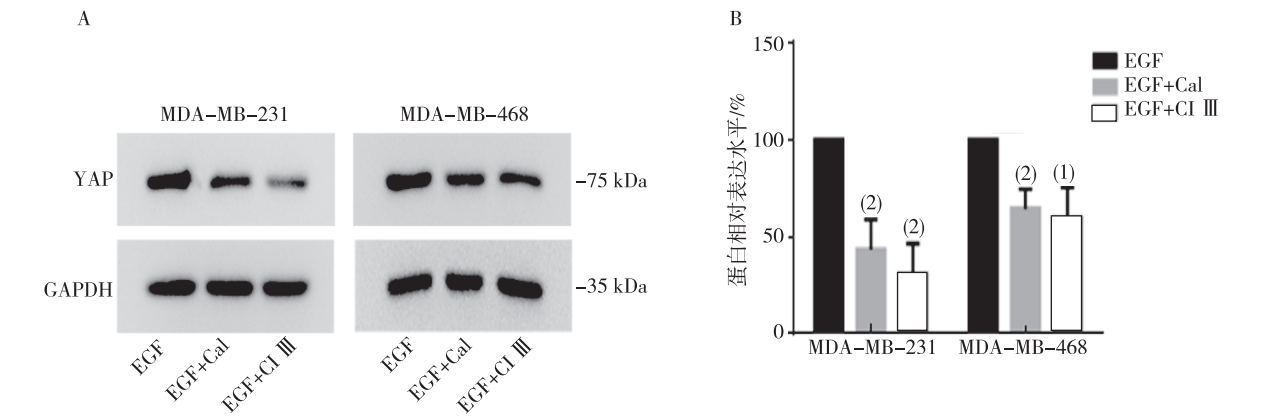
Fig. 3 Effects of CANP inhibitors on migration and invasion of MDA-MB-231 and 468 cells induced by EGF



### 2.4 CANP 抑制剂抑制对 EGF 诱导 TNBC 细胞 YAP 表达的影响

Western blot 实验结果显示,EGF 联合 Cal 组

和 EGF 联合 CI Ⅲ组中 MDA-MB-231、468 细胞 YAP 蛋白表达均低于 EGF 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见图 4。



注:A 为 Western blot 实验,B 为 Western blot 实验的条图;与 EGF 组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P<0.01$ 。

图 4 CANP 抑制剂对 EGF 诱导 MDA-MB-231、468 细胞 YAP 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of CANP inhibitors on the expression of YAP in MDA-MB-231 and 468 cells induced by EGF

## 3 讨论

乳腺癌发生在乳腺上皮细胞,是恶性程度极高的肿瘤之一,已威胁到全球女性的健康<sup>[16]</sup>。虽然全球科学家早已关注这种疾病,也为此做出了很多努力,如筛查工作和综合治疗的开展,但是死亡率没有下降,反而发病率逐渐升高<sup>[17]</sup>。因此,TNBC 高侵袭转移特点在未来预防和治疗乳腺癌过程中更应成为重点关注点。有研究显示,EGF 通过激活 Smad2/3 上调几种上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标记物<sup>[18]</sup>,同时增加乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 的迁移及侵袭能力;钙蛋白酶 1 和钙蛋白酶 2 在细胞中普遍表达,是细胞内非溶酶体细胞质需要钙激活的半胱氨酸内肽酶。CAPN 的内源特异性抑制剂是钙蛋白酶抑制蛋白,证明了恶性和良性组织中酶表达之间的差异<sup>[19]</sup>。Salehin 等<sup>[20]</sup>研究表明,通过抑制 CANP 可以达到增加乳腺癌细胞凋亡的效果,包括属于 HER2(+)或 TNBC 的 SKBR3 细胞和 MDA-MB-231 细胞;也有报道称,在丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号的作用下 CANP2 具有影响细胞黏附与迁移的能力,提示癌症中 CANP 与肿瘤的许多恶性行为学相

关<sup>[19]</sup>。以上研究表明在癌症中 CAPN 与肿瘤的许多恶性行为学相关。本研究发现,Cal 和 CI Ⅲ能明显抑制 EGF 对模型细胞侵袭迁移能力的影响。结果表明,EGF 对 TNBC 细胞的侵袭迁移能力的影响可能与 CAPN 信号通路相关,并且钙蛋白酶抑制剂预处理模型细胞,可明显抑制 EGF 对 YAP 蛋白的表达的影响,提示 EGF 通过 CAPN 信号通路对 YAP 蛋白产生影响。YAP 是在人类恶性肿瘤中普遍激活的高度相关的转录调节因子,最近的研究表明,YAP 对于癌症的发生或大多数实体瘤的生长是必需的,它们活化、诱导癌症干细胞属性、增殖、药物抗性和转移,同时也是细胞微环境的结构和机械特征的传感器,许多癌症相关的外在和内在线索共同推翻正常组织的 YAP 抑制微环境,包括机械转导、炎症及致癌信号传导<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,TNBC 的 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 细胞中,EGF 刺激可使 YAP 蛋白表达上调并且对细胞迁移、侵袭具有促进作用,Cal 和 C I Ⅲ能抑制 EGF 对模型细胞 YAP 蛋白表达和细胞迁移侵袭能力的影响。

综上所述,EGF 具有诱导 TNBC 细胞 MDA-MB-231、468 细胞迁移和侵袭,Cal 和 CI Ⅲ可以阻断 EGF 的上述生物学效应,EGF 可能通过 CANP-YAP 信号通路促进肿瘤细胞的恶性生物学行为。

## 4 参考文献

- [1] NAVRATIL J, FABIAN P, PALACOVA M, et al. Triple negative breast cancer[J]. *Klin Onkol*, 2015, 28(6): 405–415.
- [2] 石静, 牛立蓉. 三阴性乳腺癌转化医学药物领域研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(10): 1602–1604.
- [3] 黄钱, 甘淋. 雄激素受体在三阴性乳腺癌中的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2019(2): 318–321.
- [4] YOON R, STASINOPOULOS I, KIM J H, et al. COX-2 dependent regulation of mechanotransduction in human breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3): 430–437.
- [5] YU M, BARDIA A, WITTNER B S, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. *Science*, 2013, 339(6119): 580–584.
- [6] 王晶晶, 彭博, 贺荣, 等. 筋骨草和茯苓配伍合用抑制乳腺癌细胞侵袭转移作用及初步机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(4): 581–588.
- [7] SCHMIDMAIER R, BAUMANN P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15(10): 978–990.
- [8] 李勇杰, 于庆龙, 潘际刚, 等. 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[J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(10): 820–825.
- [9] NAVARINI N F, ARAUJO V C, BROWN A L, et al. The EGF signaling pathway influences cell migration and the secretion of metalloproteinases by myoepithelial cells in pleomorphic adenoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(1): 205–211.
- [10] JIANG W, TIAN W, IJAZ M, et al. Inhibition of EGF-induced migration and invasion by sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink via the suppression of EGFR/Akt/p38 MAPK/MMP-2 signaling pathway in KB cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(11): 95–102.
- [11] 齐曾鑫, 蔡加君, 姚瑜, 等. 钙蛋白酶的研究进展[J]. *中国临床神经科学*, 2013, 21(4): 456–462.
- [12] GUEGUINOU M, HARNOIS T, CROTTES D, et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36168–36184.
- [13] GUO L, TENG L. YAP/TAZ for cancer therapy: opportunities and challenges (review) [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4): 1444–1452.
- [14] ZANCONATO F, BATTILANA G, CORDENONSI M, et al. YAP/TAZ as the therapeutic targets in cancer[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016(8): 26–33.
- [15] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(4): 1287–1312.
- [16] ODLE T G. Precision medicine in breast cancer[J]. *Radiol Technol*, 2017, 88(4): 401–421.
- [17] ZHENG Y, WU C X, ZHANG M L. Breast cancer in China's epidemic situation and disease characteristics[J]. *China Oncol*, 2013(8): 561–569.
- [18] KIM J, KONG J, CHANG H, et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016(51): 85021–85032.
- [19] BUGIDE S, DAVID D, NAIR A, et al. Hematopoietic PBX-interacting protein (HPIP) is over expressed in breast infiltrative ductal carcinoma and regulates cell adhesion and migration through modulation of focal adhesion dynamics[J]. *Oncogene*, 2015, 32(35): 4601–4612.
- [20] SALEHIN D, FROMBERG I, HAUGK C, et al. Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in ovarian cancer[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011, 34(6): 628–635.

(2019-10-10 收稿, 2019-12-20 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 丁廷森