

基于 Calpain-ERK 信号通路研究 Calpeptin 对雌激素诱导人乳腺上皮细胞 MCF-10A 转化及干性标志物表达的影响^Δ

张艳^{1,2*}, 王旭东¹, 金爱¹, 何艳³, 詹云惠¹, 沈敬堃¹, 董宇华¹, 宛蕾^{2#} (1. 贵州医科大学基础医学院生理学教研室, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院药理学教研室, 贵阳 550025; 3. 贵阳市第一人民医院超声科, 贵阳 550002)

中图分类号 R737.9;R34 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)13-1549-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.13.03

摘要 目的:研究钙激活中性蛋白酶(Calpain)抑制剂 Calpeptin 对雌二醇(E₂)诱导人乳腺上皮细胞 MCF-10A 转化及干性标志物表达的影响,并探讨其作用机制。方法:以人乳腺上皮细胞 MCF-10A 为研究对象,采用 E₂ 诱导制备转化细胞模型。将细胞分为对照组[0.1% 二甲基亚砜(DMSO)]、E₂ 转化组(50 nmol/L)、E₂ 转化+Calpeptin 组(50 nmol/L E₂+1 μmol/L Calpeptin),以相应含药培养基连续培养 15 代。然后采用 MTT 法检测细胞的增殖率(24、48 h),采用平板克隆试验检测细胞的克隆形成率,采用悬浮成球试验检测细胞的成球数;采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测细胞中干性标志物(CD44、Nanog、OCT4)和细胞外信号调节激酶(ERK)mRNA 表达水平,并采用 Western blotting 法检测细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK 和磷酸化 ERK(p-ERK)蛋白表达水平。另取 E₂ 转化细胞分为对照组(0.1% DMSO)和 U0126(ERK 抑制剂)组(10 μmol/L),按上述方法测定细胞的克隆形成率、成球数以及细胞中 CD44、Nanog、OCT4、p-ERK 蛋白表达水平,以验证 ERK 表达抑制与转化细胞生物学行为及干性标志物表达之间的关系。结果:与对照组比较,E₂ 转化组细胞的增殖率(24、48 h)、克隆形成率均显著升高(P<0.01),细胞成球数均显著增加(P<0.01),细胞中 CD44、Nanog、OCT4、p-ERK mRNA 表达水平及 CD44、Nanog、OCT4、p-ERK 蛋白表达水平均显著升高(P<0.01)。与 E₂ 转化组比较,E₂ 转化+Calpeptin 组细胞的增殖率(24、48 h)、克隆形成率均显著降低(P<0.01),细胞成球数显著减少(P<0.05),细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA 表达水平及 CD44、Nanog、OCT4、p-ERK 蛋白表达水平均显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。加入 ERK 抑制剂 U0126 后,E₂ 转化细胞的克隆形成率、成球数以及细胞中 p-ERK、CD44、Nanog、OCT4 蛋白表达水平均显著增加或升高(P<0.05 或 P<0.01)。结论:Calpeptin 可抑制 E₂ 诱导的人乳腺上皮细胞 MCF-10A 转化及干性标志物表达,其机制可能与抑制 Calpain-ERK 信号通路的激活有关。

关键词 Calpeptin;雌二醇;人乳腺上皮细胞 MCF-10A;细胞转化;干性标志物;细胞外信号调节激酶;机制

Study on the Effects of Calpeptin on Estrogen-induced Transformation and Stemness Markers Expression of Mammary Epithelial Cells MCF-10A Based on Calpain-ERK Signaling Pathway

ZHANG Yan^{1,2}, WANG Xudong¹, JIN Ai¹, HE Yan³, ZHAN Yunhui¹, SHEN Jingkun¹, DONG Yuhua¹, WAN Lei² (1. Dept. of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Dept. of Ultrasonography, Guiyang First People's Hospital, Guiyang 550002, China)

- 政策分析:基于内容分析法[J].中国科技论坛,2019,(5):87-97.
- [11] 唐烨伟,樊雅琴,庞敬文,等.基于内容分析法的微课研究综述[J].中国电化教育,2015(339):74-79.
- [12] 姚俊,张丽.政策工具视角下中国养老服务政策文本量化研究[J].现代经济探讨,2018(12):33-39.
- [13] 周城熊,李美桂,林慧,等.战略性新兴产业:从政策工具、功能到政策评估[J].科学学研究,2017,35(3):346-353.
- [14] 黄萃,苏骏,施丽萍,等.政策工具视角的中国风能政策文本量化研究[J].科学学研究,2011,29(6):276-282.
- [15] 陈焰泰,张露嘉,汪沁,等.基于二阶段的新能源汽车产业支持政策评价[J].科研管理,2013,34(Suppl):167-174.
- [16] 王薇,刘云.基于内容分析法的我国新能源汽车产业发展政策分析[J].科研管理,2017,38(S1):581-591.
- [17] 国务院.中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见[Z].2019-10-20.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31660345, No.31360252)

* 硕士研究生。研究方向:抗肿瘤药理学。E-mail:2020439619@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:抗肿瘤药理学。E-mail:1325164635@qq.com

(收稿日期:2020-02-20 修回日期:2020-05-18)
(编辑:刘明伟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Calpeptin inhibitor Calpeptin on the transformation and stemness markers expression induced by estradiol (E_2), and to investigate its mechanism. METHODS: Taking human mammary epithelial cells MCF-10A as research object, transformed cells were induced by E_2 treatment. Cells were divided into control group(0.1% DMSO), E_2 -transformed group (50 nmol/L), E_2 -transformed+Calpeptin group (50 nmol/L E_2 +1 μ mol/L Calpeptin), then continuously treated with corresponding drug-containing culture medium for 15 generations. Then, MTT assay was used to determine the proliferation rate of cells (24, 48 h); plate colony test was used to detect the Clone formation rate of cells; the number of sphere-forming cells was measured by suspension spheroidization test; mRNA expressions of stemness marker (CD44, Nanog, OCT4) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) were detected by RT-qPCR, and protein expressions of CD44, Nanog, OCT4, ERK and p-ERK were detected by Western blotting assay. Another E_2 -transformed cells were divided into control group (0.1% DMSO) and U0126 (ERK inhibitor) group (10 μ mol/L). Clone formation rate, the number of sphere-forming, protein expressions of CD44, Nanog, OCT4, ERK and p-ERK were determined with above methods, and to validate the relationship of ERK inhibition with transformed cell behavior and the expression of stemness markers. RESULTS: Compared with control group, proliferation rate and clone formation rate of E_2 transformed group were increased significantly ($P<0.01$), and the number of sphere-forming was increased significantly ($P<0.01$); mRNA expression levels of CD44, Nanog, OCT4, ERK and protein expression levels of CD44, Nanog, OCT4 and p-ERK in cells were increased significantly ($P<0.01$). Compared with E_2 -transformed group, proliferation rate (24, 48 h) and clone formation rate of E_2 -transformed+Calpeptin group were decreased significantly ($P<0.01$), and the number of sphere-forming was decreased significantly ($P<0.05$); mRNA expression levels of CD44, Nanog, OCT4, ERK and protein expression levels of CD44, Nanog, OCT4, p-ERK in cells were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). After treated with ERK inhibitor U0126, clone formation rate of E_2 -transformed cells, the number of sphere-forming, protein expression levels of CD44, Nanog, OCT4 and p-ERK were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Calpeptin can inhibit the transformation and the expression of stemness markers of human mammary epithelial cells MCF-10A, and the mechanism of it may be associated with inhibiting the activation of Calpain-ERK signaling pathway.

KEYWORDS Calpeptin; Estradiol; Human mammary epithelial cells MCF-10A; Cell transformation; Stemness marker; Extracellular signal-regulated kinase; Mechanism

雌二醇(E_2)是诱导乳腺癌发生的主要风险因素^[1],其可通过激活雌激素受体(ER)或代谢产生有毒代谢产物,从而诱导乳腺上皮细胞转化以及癌变发生^[2-3]。相关研究显示,乳腺肿瘤干细胞(BCSCs)在乳腺癌的发生、维持、转移、治疗抵抗和复发中起着重要作用,而 E_2 与BCSCs的产生密切相关^[4]。人乳腺上皮细胞MCF-10A是一种非致瘤性乳腺上皮细胞,正常情况下其呈不规则多边形贴壁生长,且增殖缓慢;但经 E_2 长期诱导后,MCF-10A细胞将失去上皮细胞相关特性,胞体变大,呈长梭形贴壁生长,增殖能力增强,且具有一定的间质特征^[5]。近期有研究发现, E_2 能诱导人乳腺上皮细胞MCF-10A的自我更新、多潜能分化等干性特征增强,促进该细胞向BCSCs转化^[6]。

钙激活中性蛋白酶(Calcium-activated neutral protease,缩写为“Calpain”)是一种 Ca^{2+} 依赖型半胱氨酸蛋白酶,主要成员有Calpain-1和Calpain-2,可参与调控乳腺癌细胞的多种恶性生物学行为^[7-8]。Calpeptin是一种具有细胞穿透性的Calpain抑制剂,据相关研究报道,Calpeptin可通过抑制ER阳性乳腺癌细胞MCF-7中Calpain的活性,从而抑制细胞的迁移和侵袭^[9]。本课题组前期研究发现,在 E_2 诱导人乳腺上皮细胞MCF-10A转化的过程中,通常伴随着Calpain活性的增强^[10]。而Calpain活性增强在癌症的发生发展中具有重要作用,其参与介

导了上皮细胞转化以及癌细胞的迁移、增殖^[10-12]。但有关Calpain是否介导了 E_2 诱导的乳腺上皮细胞MCF-10A干性特征增强,尚未见文献报道。另有研究显示,细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路的激活与细胞的恶性转化密切相关^[13]。但Calpeptin是否能通过ERK通路干预乳腺上皮细胞MCF-10A转化以及干性特征增强,也同样尚未见文献报道。鉴于此,本研究旨在通过探讨Calpain抑制剂Calpeptin对 E_2 诱导乳腺上皮细胞MCF-10A转化及干性标志物(CD44、OCT4、Nanog)表达的影响,并通过探究Calpain-ERK信号通路在其中的介导作用,为阐明Calpeptin抑制 E_2 诱导乳腺癌发生的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ND2000型超微量紫外分光光度计、2001HY-6003型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);HH-W21-Cr600型电热恒温水浴箱、DW-86L486型立式超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司);FA2204N型电子天平(上海菁海仪器有限公司);ZHWY-103D型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);DYY-7C型电泳仪(北京市六一仪器厂);Epoch型全波长酶标仪(美国Bio-Tek公司);CKX41型倒置显微镜(日

本 Olympus 公司); TI-U-DS-RI2 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司); Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); TS-8 型转移脱色摇床、VORTEX-5 型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Step One Plus™ 型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 药品与试剂

E₂ 标准品(批号: WXBC5362V, 纯度: >98%)、Calpeptin(批号: C8999, 纯度: >98%)、氢化可的松标准品(批号: PHR1014, 纯度: 100%)、霍乱毒素(批号: C8052, 纯度: 95%)均购自美国 Sigma 公司; U0126(ERK 抑制剂, 美国 Med Chem Express 公司, 批号: HY-12031, 纯度: >98%); 马血清、0.25% 胰蛋白酶、B-27 添加物(50×)(美国 Gibco 公司, 批号分别为: 1893656、2046777、2046964); 表皮生长因子(EGF, 美国 PeproTech 公司, 批号: 0515AFC05); 成纤维细胞生长因子(FGFB, 中国近岸蛋白质科技有限公司, 批号: 0331504); 重组人胰岛素(上海翊圣生物科技有限公司, 批号: 11820131, 含量: 95%~105%); 磷酸盐缓冲液(PBS)粉末、1% 结晶紫染色液、5×蛋白质上样缓冲液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒、高效 RIPA 组织/快速裂解液、膜再生液(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为: 1022Q021、20180627、20190328、20191104、20190711、20190715); 青链霉素、DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司, 批号分别为: J150038、AE₂8870264); 二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: UD277257); MTT 试剂盒(北京博奥拓科技有限公司, 批号: 298-93-1); Trizol 试剂(美国 Ambion Life Technologies 公司, 批号: 149002); 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、PCR 反应试剂 SYBR® Premix Ex Taq™ II(日本 Takara 公司, 批号分别为: AK6301、AIG2363A); CD44 小鼠单克隆抗体、ERK 兔多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technolog 公司, 批号分别为: 3570S、4695S); Nanog、OCT4 兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为: ab109250、ab109183); 磷酸化 ERK(p-ERK)小鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司, 批号: SC-7383); α -微管蛋白(α -tubulin)兔多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(美国 Bioworld 公司, 批号分别为: BS1699、MB001、BS13278、BS12478); 甲醇、二甲基亚砜(DMSO)、乙醇等均为分析纯, 水为双蒸水。CD44、Nanog、OCT4、ERK 和 GAPDH 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 细胞

人乳腺上皮细胞 MCF-10A 由陆军军医大学生物化

学教研室馈赠。

2 方法

2.1 细胞培养

将人乳腺上皮细胞 MCF-10A 培养于 DMEM/F12 全培养基中(含有 10% 马血清、10 ng/mL 霍乱毒素、50 ng/mL 氢化可的松、10 μ g/mL 胰岛素、20 ng/mL EGF 以及 1% 青链霉素, 下同), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱(后文条件相同)中进行培养, 每 48 h 更换 1 次培养液。

2.2 细胞转化试验

将乳腺上皮细胞 MCF-10A 随机分为对照组、E₂ 转化组(DMSO 终体积分数为 0.1%, 下同)和 E₂ 转化+Calpeptin 组(DMSO 终体积分数为 0.1%, 下同)。3 组细胞分别以 0.1% DMSO、E₂ (50 nmol/L)、E₂ (50 nmol/L)+Calpeptin (1 μ mol/L) 连续处理 15 代, 每次传代时均加入相应药物处理, 然后按照“2.1”项下条件进行培养, 观察细胞形态变化并拍照。细胞转化标志: 细胞形态发生变化(细胞胞体变大, 胞内出现黑色颗粒, 排列紊乱, 呈长梭形贴壁生长, 具有一定的间质细胞样特性), 生长加速, 克隆形成能力增强^[9]。

2.3 MTT 试验检测细胞的增殖能力

取“2.2”项下 3 组对数生长期细胞, 分别用 0.25% 胰蛋白酶消化后, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 用 DMEM/F12 全培养基重悬并调整各组细胞密度至 4×10^4 个/mL, 然后接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L, 每组设置 5 个复孔。另外设置不加细胞只加培养基的调零孔。将培养板置于培养箱中培养至细胞贴壁, 吸弃培养液, 每孔中加入 200 μ L 不含血清的 DMEM/F12 培养基, 继续培养 24、48 h 后, 每孔中均避光加入 5% MTT 试液 20 μ L, 混匀, 培养 3 h 后, 终止培养; 弃去培养基, 加入 150 μ L DMSO 溶液, 低速振荡 10 min。使用酶标仪于 490 nm 波长下测定各孔吸光度(OD), 计算细胞增殖率。细胞增殖率(%) = (给药组 OD 值 - 调零孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零孔 OD 值) $\times 100\%$ 。试验重复 3 次。

2.4 平板克隆试验检测细胞的克隆形成能力

取“2.2”项下 3 组对数生长期细胞, 分别按 400 个/孔接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。每孔中加入 4 mL DMEM/F12 全培养基, 于培养箱中培养 14 d; 弃去培养液, 以 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min; 以 0.1% 结晶紫染色 30 min 后, 洗去染色液, 常温晾干。用相机拍照并观察其克隆集落形成情况, 使用 Image J 1.8.0 软件对克隆集落进行计数, 并计算其克隆形成率。克隆形成率(%) = (克隆集落形成数/接种细胞总数) $\times 100\%$ 。试验重复 3 次。

2.5 悬浮成球试验检测细胞的自我更新能力

取“2.2”项下 3 组处于对数生长期细胞, 分别按

5 000 个/孔接种于24孔超低黏附板中,每组设置3个复孔。每孔中加入2 mL悬浮成球试验培养基(含5 μg/mL胰岛素、2% B-27添加物、20 ng/mL EGF、20 ng/mL FGFB、1 μg/mL 氢化可的松和1%青链霉素的DMEM/F12培养基),在培养箱中培养10 d后,于显微镜下拍照并对每组的成球情况进行计数。试验重复3次。

2.6 实时荧光定量-PCR 试验检测细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA 的表达情况

取“2.2”项下3组对数生长期细胞,分别按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,每组设置2个复孔。待细胞贴壁后,以DMEM/F12培养基(不含血清)于培养箱中培养48 h。按照Trizol说明书方法操作,分离提取细胞中的总RNA,用超微量分光光度计测定各组RNA浓度。使用PrimeScript™ RT reagent Kit试剂盒并按说明书方法操作,将1 μg总RNA逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系:cDNA模板2 μL,上、下游引物各0.8 μL,SYBR® Premix Ex Taq™ II 10.4 μL、无酶水6 μL,总体系为20 μL。反应条件:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性3 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算CD44、Nanog、OCT4和ERK mRNA的表达水平(其中 C_t 表示每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数)。试验重复3次。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primer sequence and the length of amplified products

引物名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')	产物长度, bp
CD44	CTGCCGCTTTGCAGGTGTA	CATTGTGGGCAAGGTGCTATT	109
Nanog	TTTGTGGGCTGAAGAAAAC	AGGGCTGCTGAATAAGCAG	116
OCT4	GTGTTTCAGCAAAAAGACCATCT	GGCCTGCATGAGGGTTTCT	119
ERK	CTCAAGCCTTCCAACCTC	TTCCACGGCACCTTATTT	180
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTGTCATACTCTCATGG	197

2.7 Western blotting 试验检测细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK 和 p-ERK 蛋白的表达情况

取“2.2”项下3组对数生长期细胞,分别按“2.6”项下方法进行细胞接种、培养,然后以RIPA蛋白裂解液提取总蛋白,再以BCA法进行蛋白定量后进行制样。蛋白样品在80 V电压下电泳30 min后,调节电压至120 V继续电泳1 h;然后以电流300 mA转膜[聚偏氟乙烯(PVDF)膜]1.5 h,以5%脱脂奶粉室温封闭1 h;分别加入稀释比例均为1:1 000的CD44、Nanog、OCT4、ERK、p-ERK一抗和稀释比例为1:10 000的GAPDH一抗,4 ℃下孵育过夜;以1×TBST溶液洗膜3次,每次10 min;加入相应二抗(稀释比例均为1:10 000),室温下孵育1 h;以1×TBST溶液洗膜3次,每次10 min,再用ECL发光试剂盒显色。以凝胶成像系统成像,并用Image J 1.8.0软件分析,以目的蛋白条带灰度值与内参GAPDH蛋白条带灰

度值的比值表示目的蛋白的表达水平。试验重复3次。

2.8 U0126抑制ERK蛋白表达后对E₂转化细胞克隆形成能力、自我更新能力以及干性标志物表达的影响

取对数生长期的E₂转化细胞,随机分为对照组(含0.1% DMSO)和U0126(ERK抑制剂)组(10 μmol/L)。分别按“2.4”项下方法检测细胞的克隆形成能力,按“2.5”项下方法检测细胞自我更新能力,按“2.7”项下方法检测细胞中CD44、Nanog、OCT4和p-ERK蛋白的表达情况(以α-tubulin为内参,稀释比例为1:10 000)。试验均重复3次。

2.9 统计学方法

采用SPSS 11.5软件对数据进行统计处理和分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两独立样本组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Calpeptin对E₂转化细胞形态学特征的影响

细胞形态学观察发现,与对照组比较,E₂转化组细胞形态发生了明显变化,细胞呈长梭形贴壁生长,细胞体积变大,具有一定的间质细胞样特征;E₂转化+Calpeptin组细胞形态与对照组接近。各组细胞形态学特征显微图见图1。

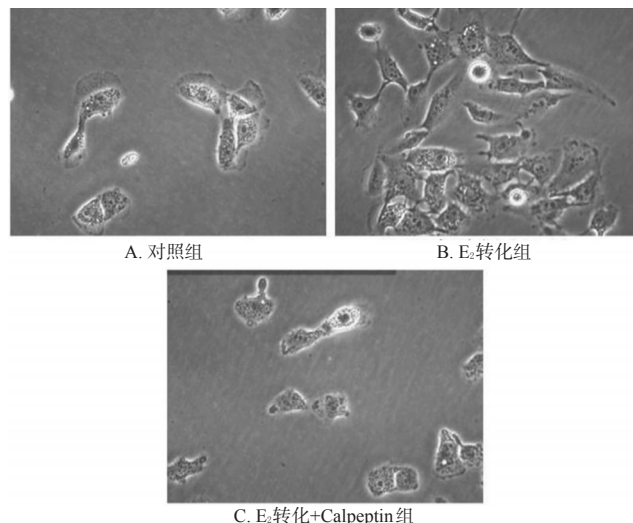


图1 各组细胞的形态学特征显微图(×200)

Fig 1 Micrographs of orphological characteristic of cells in each group (×200)

3.2 Calpeptin对E₂转化细胞增殖能力的影响

培养24、48 h后,与对照组比较,E₂转化组细胞的增殖率均显著升高($P < 0.01$);与E₂转化组比较,E₂转化+Calpeptin组细胞的增殖率均显著降低($P < 0.01$)。各组细胞增殖率测定结果见表2。

3.3 Calpeptin对E₂转化细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较,E₂转化组细胞的克隆形成率显著升

高($P<0.01$);与E₂转化组比较,E₂转化+Calpeptin组细胞的克隆形成率显著降低($P<0.01$)。各组细胞克隆形成情况平板图见图2,克隆形成率测定结果见表3。

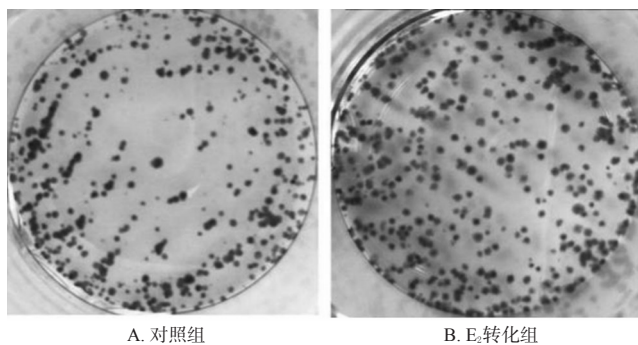
表2 各组细胞增殖率测定结果($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Proliferation rate of cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

组别	24 h	48 h
对照组	100.00±0.00	100.00±0.00
E ₂ 转化组	152.58±6.24**	165.26±5.67**
E ₂ 转化+Calpeptin组	101.07±7.51 [#]	93.18±4.12 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与E₂转化组比较,[#] $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. E₂-transformed group, [#] $P<0.01$



A. 对照组

B. E₂转化组

C. E₂转化+Calpeptin组

图2 各组细胞克隆形成情况平板图

Fig 2 Plate charts of colone formation of cells in each group

表3 各组细胞的克隆形成率测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 3 Clone formation rate of cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

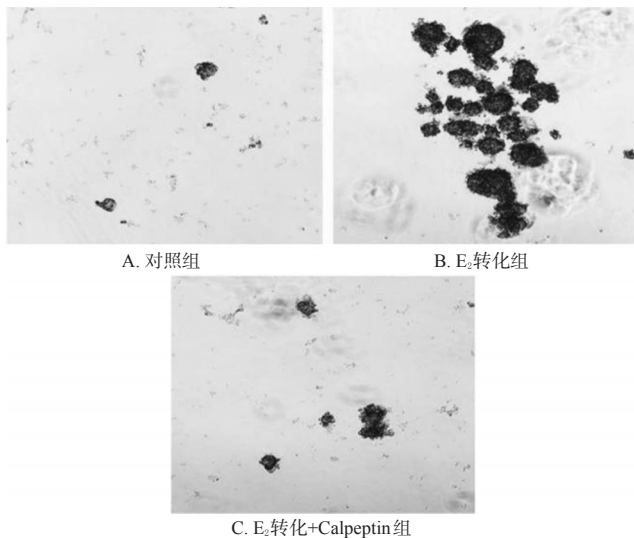
组别	克隆形成率, %
对照组	26.08±2.82
E ₂ 转化组	59.58±4.46**
E ₂ 转化+Calpeptin组	32.00±1.75 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与E₂转化组比较,[#] $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. E₂-transformed group, [#] $P<0.01$

3.4 Calpeptin对E₂转化细胞自我更新能力的影响

与对照组比较,E₂转化组细胞的成球数显著增加($P<0.01$);与E₂转化组比较,E₂转化+Calpeptin组细胞的成球数显著减少($P<0.05$)。各组细胞成球情况显微图见图3,成球数测定结果表4。



A. 对照组

B. E₂转化组

C. E₂转化+Calpeptin组

图3 各组细胞成球情况显微图(×40)

Fig 3 Micrographs of spheroidization of cells in each group (×40)

表4 各组细胞的成球数测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 4 Numbers of sphere-forming of cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	成球数, 个
对照组	6.67±1.33
E ₂ 转化组	43.34±6.66**
E ₂ 转化+Calpeptin组	18.01±2.85 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与E₂转化组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. E₂-transformed group, [#] $P<0.05$

3.5 Calpeptin对E₂转化细胞中CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA表达的影响

与对照组比较,E₂转化组细胞中CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA的表达水平均显著升高($P<0.01$);与E₂转化组比较,E₂转化+Calpeptin组细胞中CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA的表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞中4种标志物mRNA表达水平测定结果见表5。

表5 各组细胞中CD44、Nanog、OCT4、ERK mRNA表达水平测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 5 mRNA expression levels of CD44, Nanog, OCT4 and ERK of cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	CD44	Nanog	OCT4	ERK
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
E ₂ 转化组	3.91±0.38**	2.45±0.26**	3.89±0.28**	1.59±0.07**
E ₂ 转化+Calpeptin组	1.77±0.18 [#]	1.64±0.20 [#]	1.32±0.09 [#]	1.14±0.04 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与E₂转化组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

Note: vs. control group, ** $P<0.01$; vs. E₂-transformed group, [#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

3.6 Calpeptin 对 E₂ 转化细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK 和 p-ERK 蛋白表达的影响

与对照组比较, E₂ 转化组细胞中 CD44、Nanog、OCT4 和 p-ERK 蛋白的表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与 E₂ 转化组比较, E₂ 转化+Calpeptin 组细胞中 CD44、Nanog、OCT4、p-ERK 蛋白的表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 3 组细胞中 ERK 蛋白表达水平间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK、p-ERK 蛋白表达电泳图见图 4, 蛋白表达水平测定结果见表 6。

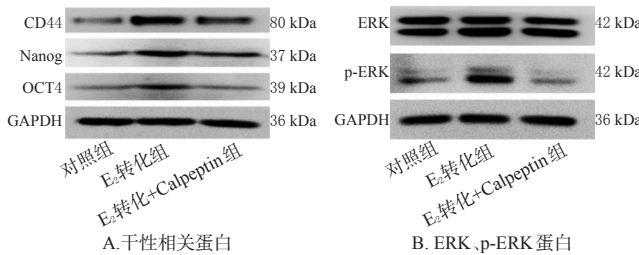


图 4 各组细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK、p-ERK 蛋白表达电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of protein expression of CD44, Nanog, OCT4, ERK and p-ERK of cells in each group

表 6 各组细胞中 CD44、Nanog、OCT4、ERK、p-ERK 蛋白表达水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 6 Protein expression levels of CD44, Nanog, OCT4, ERK and p-ERK of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CD44/GAPDH	Nanog/GAPDH	OCT4/GAPDH	ERK/GAPDH	p-ERK/GAPDH
对照组	0.78 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.52 ± 0.08	0.41 ± 0.04
E ₂ 转化组	1.39 ± 0.11**	0.51 ± 0.04**	0.45 ± 0.03**	0.50 ± 0.08	0.77 ± 0.07**
E ₂ 转化+Calpeptin组	0.90 ± 0.09#	0.32 ± 0.01#	0.26 ± 0.05*	0.46 ± 0.11	0.30 ± 0.03**

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 E₂ 转化组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$; vs. E₂-transformed group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.7 ERK 表达被抑制后对 E₂ 转化细胞的克隆形成能力、自我更新能力以及干性相关蛋白表达的影响

与对照组比较, U0126 组中 p-ERK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 表明 ERK 蛋白表达被抑制; 细胞的克隆形成率显著降低 ($P < 0.01$), 成球数显著减少 ($P < 0.05$), 干性相关蛋白 (CD44、Nanog、OCT4) 的表达水平也显著降低 ($P < 0.05$)。这提示抑制 ERK 表达后, E₂ 转化细胞的克隆形成能力、自我更新能力以及干性相关蛋白的表达均减弱。ERK 抑制剂 U0126 作用下各组细胞中 ERK、p-ERK 蛋白和干性相关蛋白表达测定结果见图 5、表 7, 细胞克隆形成和细胞成球情况测定结果见图 6、表 8。

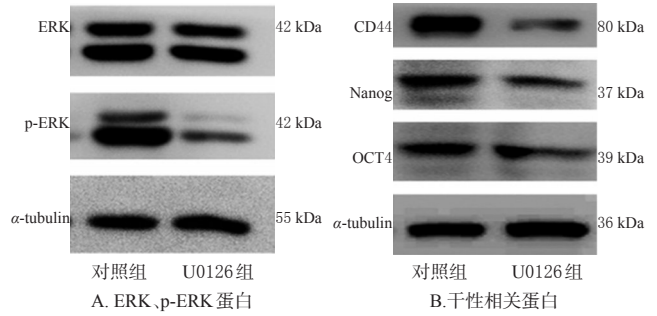


图 5 ERK 抑制剂 U0126 作用下 E₂ 转化细胞中 ERK、p-ERK 蛋白和干性相关蛋白表达的电泳图

Fig 5 Electrophoretograms of ERK, p-ERK protein and stemness-related protein expression in E₂-transformed cells after treated with ERK inhibitor U0126

表 7 ERK 抑制剂 U0126 作用下 E₂ 转化细胞中 ERK、p-ERK 蛋白和干性相关蛋白表达水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 7 Protein expression levels of ERK, p-ERK and stemness-related protein in E₂-transformed cells after treated with ERK inhibitor U0126 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ERK/ α -tubulin	p-ERK/ α -tubulin	CD44/ α -tubulin	Nanog/ α -tubulin	OCT4/ α -tubulin
对照组	2.91 ± 0.10	2.43 ± 0.13	0.48 ± 0.06	0.69 ± 0.08	0.32 ± 0.02
U0126组	2.67 ± 0.16	1.57 ± 0.18*	0.20 ± 0.02*	0.38 ± 0.05*	0.18 ± 0.03*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$

4 讨论

乳腺上皮细胞发生转化是乳腺癌发生的必要过程。肿瘤干细胞是细胞内具有自我更新、多潜能分化和肿瘤特殊生物学行为的一类细胞亚群, 与癌症的发生发展密切相关^[14]。近期有研究显示, E₂ 可以促进乳腺上皮细胞 MCF-10A 获得干细胞特性^[6]。CD44、Nanog 和 OCT4 均是公认的癌症干细胞标志物。据报道, CD44 可通过与细胞外基质成分、生长因子和细胞因子相互作用来促进肿瘤的发生^[15]。而 Nanog 和 OCT4 在多种癌症干细胞中都呈异常高表达状态, 其高表达后能够促进细胞的重新编程, 从而调控肿瘤细胞增殖、自我更新和多能性分化等干细胞特征^[16-17]。本研究采用 E₂ 连续培养乳腺上皮细胞 MCF-10A 15 代, 发现 E₂ 处理后细胞出现了一定的间质细胞样特征, 细胞活力、克隆形成能力以及自我更新能力均显著增强, 这表明细胞在 E₂ 作用下发生了转化。同时, E₂ 转化细胞中干性标志物 CD44、Nanog、OCT4 mRNA 及其蛋白的表达均显著上调, 这提示 E₂ 不仅可诱导细胞转化, 还可增强转化细胞的干性特征。

Calpain 的生物学活性与肿瘤的发生有关, 其可通过修饰性剪切多种肿瘤抑制蛋白, 促进上皮细胞的转

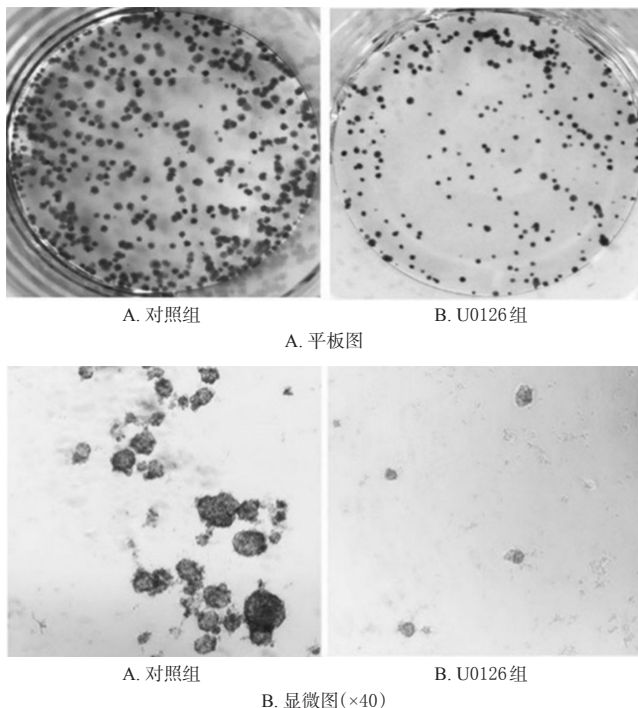


图6 ERK抑制剂U0126作用下E₂转化细胞克隆情况平板图和成球情况显微图

Fig 6 Plate charts of clone formation and micrographs of spheroidization of E₂-transformed cells after treated with ERK inhibitor U0126

表8 ERK抑制剂U0126作用下E₂转化细胞的克隆形成率、成球数测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 8 Clone formation rate and numbers of spheroid-forming of E₂ transformed cells after treated with ERK inhibitor U0126($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	克隆形成率, %	成球数, 个
对照组	67.67±2.05	47.67±3.48
U0126组	39.67±2.85**	27.00±1.73*

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

化^[18-19]。Calpain抑制剂Calpeptin是一种具有细胞渗透性的特异性抑制剂。据相关文献报道,Calpeptin在1~10 μmol/L浓度范围内能显著抑制E₂诱导的人乳腺癌细胞MCF-7的增殖^[20]。本课题组前期研究也发现,10 μmol/L Calpeptin能显著抑制E₂诱导的MCF-10A转化细胞的增殖^[21]。故在本次研究的预试验中,笔者先是以1、5、10 μmol/L Calpeptin联合E₂连续处理细胞MCF-10A 15代。结果发现,在5、10 μmol/L Calpeptin的作用下细胞逐渐凋亡,只有在1 μmol/L浓度下细胞能够正常生长,同时能显著抑制E₂诱导的细胞转化。所以,在本次探讨Calpeptin对E₂诱导人乳腺上皮细胞MCF-10A转化和干性特征的影响机制研究中,笔者选择1 μmol/L为干预浓度。结果发现,该浓度下Calpeptin可抑制E₂诱导乳腺上皮细胞MCF-10A的转化和干性特征的增强,这

提示Calpain可能参与介导了E₂诱导的细胞转化和干性特征增强。

当ERK信号通路被激活时,非活性ERK被磷酸化为活化形式的p-ERK,并由细胞质转移至细胞核内,转录激活核内的转录因子,进而促进细胞增殖、分化以及癌症发生^[22]。有研究显示,ERK信号通路的激活与乳腺癌^[23-24]、肺癌^[25-26]、甲状腺癌^[27]等癌症细胞的增殖、迁移以及干细胞特性增强相关。本研究结果显示,E₂转化组细胞可高表达ERK mRNA和p-ERK蛋白,但E₂转化+Calpeptin组细胞ERK mRNA和p-ERK蛋白的表达明显下调,这提示Calpeptin抑制E₂诱导的细胞转化以及干性标志物表达的作用可能与抑制ERK信号通路的激活有关。为了验证以上结论,笔者进一步以ERK特异性抑制剂U0126处理E₂转化细胞。结果发现,经U0126处理后,细胞的增殖能力和自我更新能力均显著减弱,干性相关蛋白的表达也显著下调,这进一步说明ERK信号通路可能参与介导了E₂诱导乳腺上皮细胞MCF-10A转化及其干性增强。有文献报道,E₂可通过激活Calpain-ERK信号通路促进ER阳性乳腺癌细胞的增殖^[28]。但本研究发现,Calpain抑制剂Calpeptin在抑制E₂诱导细胞转化的同时,能显著下调E₂诱导的p-ERK蛋白的表达。由此推测,细胞内可能存在Calpain-ERK的正反馈环路,后者在E₂作用下被激活,促进Calpain活性增强,从而参与诱导细胞转化及其干性增强;而当Calpain活性被抑制时,可能反馈性调节ERK的磷酸化作用,抑制了ERK的磷酸化,从而抑制细胞转化以及干性增强。

综上所述,Calpeptin能抑制E₂诱导的人乳腺上皮细胞MCF-10A转化及干性标志物的表达,其机制可能与抑制Calpain-ERK信号通路的激活有关,但其具体作用靶点和机制有待后续研究进一步确证。

参考文献

- [1] WEN C, WU L, FU L, et al. Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen: review[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1001-1006.
- [2] CHEN JQ, RUSSO PA, COOKE C, et al. ERβ shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(12): 1732-1746.
- [3] SAMAVAT H, KURZAR MS. Estrogen metabolism and breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(200): 231-243.
- [4] VOUTSADAKIS IA. HER2 in stemness and epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(5): 539-555.
- [5] 杨莉,李阳,朱筑霞,等. FAK在雌激素诱导MCF-10A乳腺上皮细胞转化中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2013,

42(20):2376-2377.

- [6] DAS JK, FELTY Q, POPPITI R, et al. Nuclear respiratory factor 1 acting as an oncoprotein drives estrogen-induced breast carcinogenesis[J]. *Cells*, 2018, 7(12):234-256.
- [7] HOSKIN V, SZETO A, GHAFARI A, et al. Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(19):3464-3479.
- [8] STORR SJ, THOMPSON N, PU X, et al. Calpain in breast cancer: role in disease progression and treatment response [J]. *Pathobiology*, 2015, 82(3/4):133-141.
- [9] LI CL, YANG D, CAO X, et al. Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):3889-3895.
- [10] 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, 33(7):819-823.
- [11] CARRAGHER NO, FONSECA BD, FRAME MC. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological function[J]. *Neoplasia*, 2004, 6(1):53-73.
- [12] XU F, GU J, LU C, et al. Calpain-2 enhances non-small cell lung cancer progression and chemoresistance to paclitaxel via EGFR-pAKT pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1):127-137.
- [13] MENG J, ZHOU X, YANG J, et al. Exposure to low dose ZnO nanoparticles induces hyperproliferation and malignant transformation through activating the CXCR2/NF-KappaB/STAT3/ERK and AKT pathways in colonic mucosal cells[J]. *Environ Pollut*, 2020, 263 (PtB) : 114578-114589.
- [14] ASADZADEH Z, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. microRNAs in cancer stem cells: biology, pathways, and therapeutic opportunities[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10002-10017.
- [15] MORATH I, HARTMAN TN, ORIAN-ROUSSEAU V. CD44: more than a mere stem cell marker[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt A):166-173.
- [16] ZHANG W, SUI Y, NI J, et al. Insights into the Nanog gene: a propeller for stemness in primitive stem cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(11):1372-1381.
- [17] TSAI PH, CHIEN Y, WANG ML, et al. Ash21 interacts with Oct4-stemness circuitry to promote super-enhancer-driver pluripotency network[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(19):10115-10133.
- [18] KIMURA Y, SAYA H, NAKAO M. Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas[J]. *Neuropathology*, 2000, 20(3):153-160.
- [19] SALIMI R, BANDARU S, DEVARAKONDA S, et al. Blocking the cleavage of filamin A by Calpain inhibitor decreases tumor cell growth[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4):2079-2085.
- [20] 王旭东,丁姗姗,陈腾祥,等.钙激活中性蛋白酶抑制剂对E₂诱导的乳腺癌细胞增殖效应的影响及其意义[J].*贵州医药*, 2009, 33(4):302-304.
- [21] 郭阳,金爱,杨莉,等.钙蛋白酶2介导雌激素调控乳腺癌细胞GREB1基因表达[J].*贵州医科大学学报*, 2018, 43(6):630-635.
- [22] RODRIGUEZ-AGUAYO C, BAYRAKTAR E, IVAN C, et al. PTGER3 induces ovary tumorigenesis and confers resistance to cisplatin therapy through up-regulation Ras-MAPK/Erk-ETS1-ELK1/CFTR1 axis[J]. *EBioMedicine*, 2019. DOI:10.1016/j.ebiom.2018.11.045.
- [23] TANG T, ZHU Q, LI X, et al. Protease Nexin I is a feedback regulator of EGF/PKC/MAPK/EGFR1 signaling in breast cancer cells metastasis and stemness[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):649-665.
- [24] 田继华,常思佳,郭海秀,等. ERK 抑制剂 U0126 通过下调 cyclin D1 与 survivin 蛋白表达抑制乳腺癌细胞增殖 [J].*中国药理学通报*, 2019, 35(8):1061-1066.
- [25] YANG YC, CHIOU PC, CHEN PC, et al. Melatonin reduced lung cancer stemness through inhibiting of PLC, ERK, P38, beta-catenin and Twist pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(2):203-209.
- [26] 劳志云,吴东平,王志勇,等. Cathepsin B 通过 ERK 信号通路促进肺癌细胞 A549 增殖和迁移[J].*临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(5):391-395.
- [27] CHOI C, THI TT, VAN NGUT, et al. Promotion of tumor progression and cancer stemness by MUC15 in thyroid cancer via the GPCR/ERK and integrin-FAK signaling pathways[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(11):85-97.
- [28] WANG GS, HUANG YG, LI H, et al. ERK/CANP rapid signaling mediates 17 beta-estradiol-induced proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(1):156-162.

(收稿日期:2020-03-02 修回日期:2020-05-13)

(编辑:林 静)