

钙蛋白酶抑制剂对纤连蛋白诱导的 MCF-10A 乳腺上皮细胞-间质转化的影响

洪端阳¹, 陈林¹, 张彦燕¹, 王婧¹, 王昌权¹, 陈妍^{1,2*}, 沈祥春^{1,2*}

(1. 贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2. 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 本研究观察钙蛋白酶抑制剂 (ALLN 和 calpain inhibitor IV) 对纤连蛋白 (FN) 诱导的 MCF-10A 乳腺上皮细胞-间质转化 (EMT) 的影响。FN 作用 MCF-10A 细胞 48 h 后, 采用划痕修复实验检测 MCF-10A 细胞的迁移能力; 基质胶包被的 transwell 小室实验检测细胞的侵袭能力; Western blot 法检测波形蛋白 (vimentin)、E-钙粘着蛋白 (E-cadherin)、锌指蛋白 (snail) 和钙蛋白酶-2 (calpain-2) 的表达。研究结果显示, FN 诱导 MCF-10A 细胞形态发生改变; 显著增加 MCF-10A 细胞的迁移和侵袭能力; 上调 calpain-2、vimentin 和 snail 蛋白表达, 下调 E-cadherin 蛋白水平。ALLN 和 calpain inhibitor IV 能显著抑制 FN 诱导的 MCF-10A 细胞形态变化、迁移和侵袭能力增强、vimentin、snail 和 calpain-2 蛋白表达上调及 E-cadherin 蛋白表达下调。以上研究结果表明, FN 诱导 MCF-10A 乳腺上皮细胞发生 EMT 可能与上调 calpain-2 的表达有关, ALLN 和 calpain inhibitor IV 能够抑制 FN 诱导的上皮间质转化。

关键词: 钙蛋白酶抑制剂; MCF-10A 乳腺上皮细胞; 纤连蛋白; 上皮间质转化; 钙蛋白酶
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0569-06

The inhibitory effects of calpain inhibitors on epithelial-mesenchymal transition of MCF-10A mammary epithelial cells induced by fibronectin

HONG Duan-yang¹, CHEN Lin¹, ZHANG Yan-yan¹, WANG Jing¹, WANG Chang-quan¹,
CHEN Yan^{1,2*}, SHEN Xiang-chun^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medical Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. The High Educational Key Laboratory of Guizhou Province for Natural Medicinal Pharmacology and Druggability, Guiyang 550025, China)

Abstract: The aim of this research is to investigate the inhibitory effects of calpain inhibitors (ALLN and calpain inhibitor IV) on mammary epithelial-mesenchymal transition (EMT) of MCF-10A cells induced by fibronectin (FN). After FN treatment of MCF-10A cells for 48 h, cell migration and invasion were determined by scratch repair assay and matrigel coated transwell assay, respectively. Vimentin, E-cadherin, snail and calpain-2 protein expression were measured by Western blot. The results suggest that FN induced morphological changes in MCF-10A cells, significantly increased the migration and invasion abilities of MCF-10A cells, upregulated

收稿日期: 2016-12-11; 修回日期: 2017-01-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560598, 81302804); 中国博士后基金 (2015M582759XB); 贵阳市科技局项目 (筑科合同[20141001]); 贵州省教育厅自然科学基金优秀人才计划 (黔教合 KY 字[2015]492); 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字[2014]2007 号); 贵州省 2016 年大学生创新创业训练计划项目 (201610660042); 贵州省高等教育科技创新团队 (黔教合人才团队字[2014]31); 贵州省科技创新团队 (黔科合人才团队[2015]4025 号); 贵州省高层次创新型人才百层次人才 (贵州省科技厅黔科合人才[2015]4029 号); 贵州医科大学开放性实验 (070701817).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-851-8416149, E-mail: 457335071@qq.com; shenxiangchun@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1181

the expression of calpain-2, vimentin and snail, and downregulated the expression of E-cadherin. All such changes by FN were reversed with ALLN and calpain inhibitor IV. In conclusion, the upregulation of calpain-2 was involved in FN-induced EMT of MCF-10A mammary epithelial cells, which may be inhibited by ALLN and calpain inhibitor IV.

Key words: calpain inhibitor; MCF-10A mammary epithelial cells; fibronectin; epithelial-mesenchymal transformation; calpain

乳腺癌是威胁女性健康的主要恶性肿瘤, 目前乳腺癌的发病率逐年上升, 且发病年龄呈年轻化发展^[1]。上皮细胞-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞在形态学上发生间质细胞表型的转变过程^[2]。近年来的大量研究表明, EMT 广泛参与了乳腺癌的致病过程^[3]。Park 等^[4]研究证明, 纤连蛋白 (fibronectin, FN) 与 EMT 密切相关, FN 是细胞外基质的大分子糖蛋白, 也是乳腺上皮细胞微环境中的重要成分, 影响细胞迁移、生长、形态、分化和致癌性转变^[5]。在 FN 作用下, 乳腺上皮细胞逐渐失去原有的极性, 从生长抑制状态转变为增殖状态, 并发生上皮间质转化, 使细胞发生胞间黏附减少、迁移和侵袭能力增强等肿瘤样行为的变化^[6]。

钙蛋白酶 (calpain) 是一种 Ca^{2+} 依赖性的蛋白分解酶^[7], 主要有两种亚型, 钙蛋白酶-1 (calpain-1) 和钙蛋白酶-2 (calpain-2)^[8]。有研究报道表明 calpain 能将骨桥蛋白水解为活性小分子片段, 介导丙肝病毒诱导肝细胞 EMT^[9]。此外, 应用同位素标记技术和串联质谱检测发现在转化生长因子- β 诱导 A549 肺癌细胞 EMT 的过程中, calpain 等 14 种与细胞骨架和运动有关的蛋白表达上调。以上研究提示, calpain 蛋白表达增加可能是调控 EMT 的一个重要环节^[10], 但 calpain 是否在 FN 诱导的 EMT 中发挥作用尚不清楚。本研究通过建立 FN 诱导的 EMT 体外模型, 观察钙蛋白酶抑制剂 (ALLN 和 calpain inhibitor IV) 对 FN 诱导的上皮间质转化的影响, 并对其作用机制进行初步探讨, 为其应用于乳腺癌的防治提供新的研究思路。

材料与方法

细胞株及试剂 正常人乳腺上皮细胞株 MCF-10A 购自中国科学院昆明细胞库, DMEM/F12 培养基、马血清 (horse serum, HS)、青霉素/链霉素 (penicillin/streptomycin)、氢化可的松 (hydrocortisone, HC)、生长因子 (epithelial growth factor, EGF)、胰岛素 (insulin)、霍乱毒素 (cholera toxin) 及胰蛋白酶 (trypsin) 购自美国 HyClone 公司。纤连蛋白、钙蛋白

酶抑制剂 (ALLN 和 calpain inhibitor IV) 购自 Sigma 公司, 抗 vimentin、E-cadherin、snail 及 calpain-2 单克隆抗体购自 Santa Cruze 公司, 抗 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling 公司, 羊抗兔/羊抗鼠 IgG-HRP 抗体购自博士德公司。

细胞培养 正常人乳腺上皮细胞 MCF-10A 常规培养采用 DMEM/F12 培养基 (含 10% HS、1% 青霉素/链霉素、0.1% HC、0.02% EGF、0.1% 胰岛素、0.01% 霍乱毒素), 在 37 °C 及 5% CO_2 的条件下进行培养, 待细胞覆盖率达 90%~100% 时进行传代培养。

细胞划痕实验 按照划痕修复实验法^[11]将细胞随机分为 4 组, 分别加入无血清培养基 (control) 和含 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FN、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FN + 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ALLN、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FN + 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ calpain inhibitor IV 处理, 其中 ALLN 和 calpain inhibitor IV 在加入 FN 前预处理 1 h, 置于培养箱内培养。分别于 0 h 和 48 h 在倒置显微镜下拍照。计算细胞迁移率 = (0 h 伤口宽度 - 48 h 伤口宽度) / 0 h 伤口宽度 \times 100%, 实验重复 3 次, 进行统计学分析。

细胞侵袭实验 培养的 MCF-10A 细胞覆盖率达 90% 后, 将培养基换成无血清 DMEM, 同时按“细胞划痕实验”将细胞分为 4 组, 并施以相同处理。按照 transwell 小室侵袭实验法^[12]重复 3 次。以 control 组的微孔滤膜细胞数为对照, 各组穿过 Matrigel 胶的细胞数与其相比所得百分率表示细胞的侵袭能力。

Western blot 检测 培养的 MCF-10A 细胞覆盖率达 90% 后, 将培养基换为无血清 DMEM, 同时按“细胞划痕实验”将细胞分为 4 组, 并施以相同处理。药物处理 48 h 后, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞。4 °C、12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后取样品上清液留用, 采用 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量。每个泳道按 40 μg 蛋白质样品进行上样, 按照 Western blot 法^[12]实验, 检测 vimentin、E-cadherin、snail 和 calpain-2 的蛋白表达。采用 Bio-Rad 系统进行成像, Image Lab 软件分析蛋白印迹结果。

统计学处理 采用 SPSS 19.0 处理和分析数据, 实验结果以均值 \pm 标准差表示。组间比较采用单因素

方差分析法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 FN 对 MCF-10A 细胞中 calpain-2 蛋白表达的影响

FN ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 MCF-10A 细胞 0、12、24 和 48 h 后, 与 0 h 相比, calpain-2 蛋白表达逐渐增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。FN 使 MCF-10A 细胞中的 calpain-2 蛋白表达增加 (图 1)。

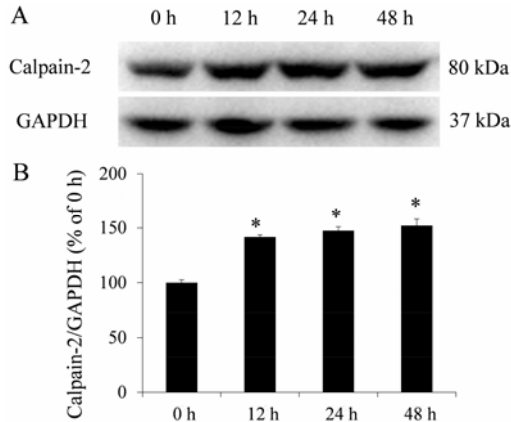


Figure 1 The effect of fibronectin (FN) on calpain-2 protein expression of MCF-10A cells. A: The representative photographs; B: The statistical analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs 0 h

2 钙蛋白酶抑制剂对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞中 calpain-2 蛋白表达的影响

与对照组相比, FN ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 48 h 后, calpain-2 蛋白表达显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); (FN+ALLN) 和 (FN+calpain inhibitor IV) 组与 FN 组相比, calpain-2 蛋白表达显著降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。钙蛋白酶抑制剂 (ALLN 和 calpain inhibitor IV) 能显著抑制 FN 诱导的 MCF-10A 细胞中 calpain-2 蛋白表达上调 (图 2)。

3 钙蛋白酶抑制剂对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞形态的影响

FN ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 MCF-10A 细胞 48 h 后, 对照组细胞形态为鹅卵石状, 细胞之间黏附力较强, 结构紧密。与对照组细胞相比, FN 组细胞拉长呈纺锤形, 细胞之间黏附力降低, 结构松散, 形态接近成纤维细胞; 与 FN 组细胞相比, (FN+ALLN) 和 (FN+calpain inhibitor IV) 组细胞之间黏附力增强, 结构紧密, 细胞形态接近鹅卵石状 (图 3)。以上结果说明, 钙蛋白酶抑制剂 ALLN 和 calpain inhibitor IV 能够逆转 FN 诱导的 MCF-10A 细胞形态变化。

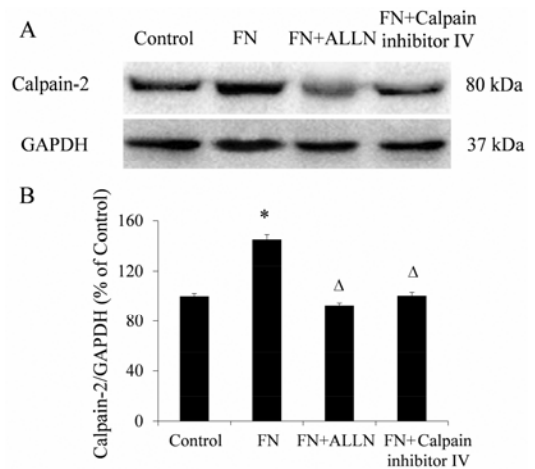


Figure 2 The effect of calpain inhibitors on calpain-2 expression of MCF-10A cells induced by FN. A: The representative photographs; B: The statistical analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs FN

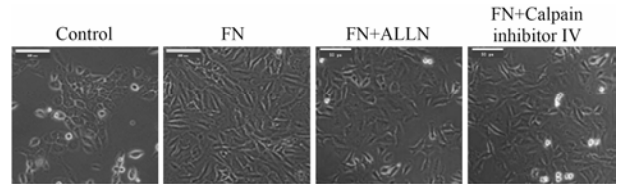


Figure 3 The effect of calpain inhibitors on morphology of MCF-10A cells induced by FN. Scale bar = 40 μm

4 钙蛋白酶抑制剂对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞迁移能力的影响

划痕修复实验结果表明, 与对照组相比, FN ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 48 h 后, 细胞的迁移率增加到 (188.9 ± 1.8)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); (FN+ALLN) 和 (FN+calpain inhibitor IV) 组与 FN 组相比, 细胞的迁移率分别降低到 (92.3 ± 6.1)% 和 (98.8 ± 1.7)%, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4)。钙蛋白酶抑制剂 ALLN 和 calpain inhibitor IV 对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞迁移有明显的抑制作用。

5 钙蛋白酶抑制剂对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞侵袭能力的影响

基质胶包被的 transwell 小室实验结果表明, FN ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用 48 h 后, 侵袭细胞数增加到 (234.5 ± 9.4)%, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); (FN+ALLN) 和 (FN+calpain inhibitor IV) 组侵袭细胞数分别降低到 (102.4 ± 6.1)% 和 (116.7 ± 7.3)%, 与 FN 组相比, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。钙蛋白酶抑制剂 ALLN 和 calpain inhibitor IV 对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞侵袭有明显的抑制作用。

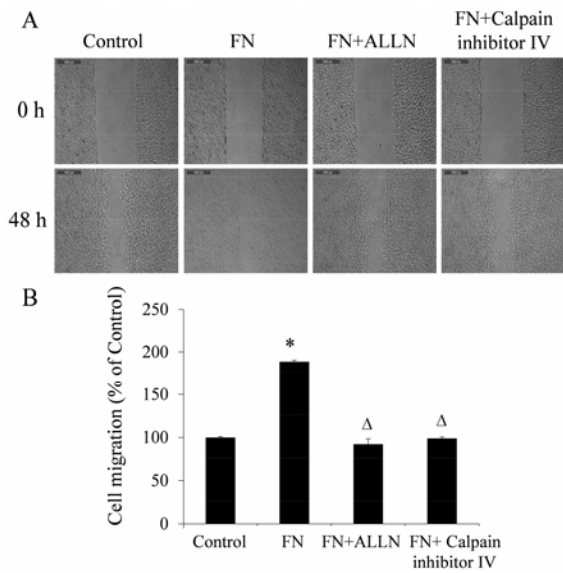


Figure 4 The effect of calpain inhibitors on MCF-10A cells migration induced by FN. A: The representative photographs, scale bar = 400 μ m; B: The statistical analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs FN

6 钙蛋白酶抑制剂对 FN 诱导的 MCF-10A 细胞中 vimentin、E-cadherin 和 snail 蛋白表达的影响

与对照组相比, FN (20 μ g·mL⁻¹) 作用 48 h 后, vimentin 和 snail 蛋白表达显著增加, E-cadherin 蛋白表达显著降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); (FN+ALLN) 和 (FN+calpain inhibitor IV) 组与 FN 组相比, vimentin 和 snail 蛋白表达显著降低, E-cadherin 蛋白表达显著增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 6)。钙蛋白酶抑制剂 ALLN 和 calpain

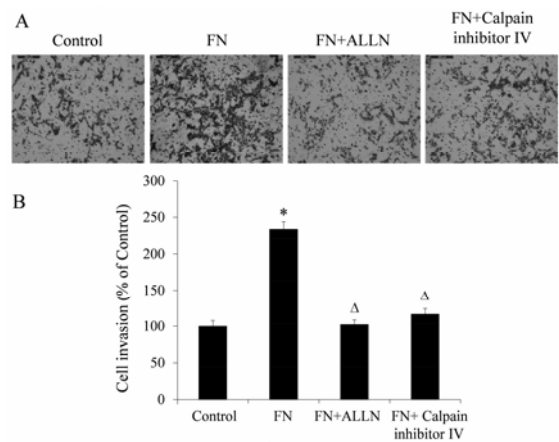


Figure 5 The effect of calpain inhibitors on MCF-10A cells invasion induced by FN. A: The representative photographs, scale bar = 200 μ m; B: The statistical analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs FN

inhibitor IV 能显著抑制 FN 诱导的 MCF-10A 细胞中 vimentin 和 snail 蛋白表达上调及 E-cadherin 蛋白表达下调。

讨论

上皮间质转化是肿瘤细胞自身塑形的重要标志^[13], EMT 在乳腺癌的发展、浸润和转移方面有着密切联系^[14]。当细胞发生 EMT 时, 细胞极性消失, 转变为有间质细胞形态和特性的细胞^[15]。这种转变使细胞间的黏附能力减弱、细胞的运动和侵袭能力增强, 使细胞获得可塑性、迁移、侵袭、对抗凋亡的能力及干细胞样特征^[16], 从而促进肿瘤的发生和发展。EMT

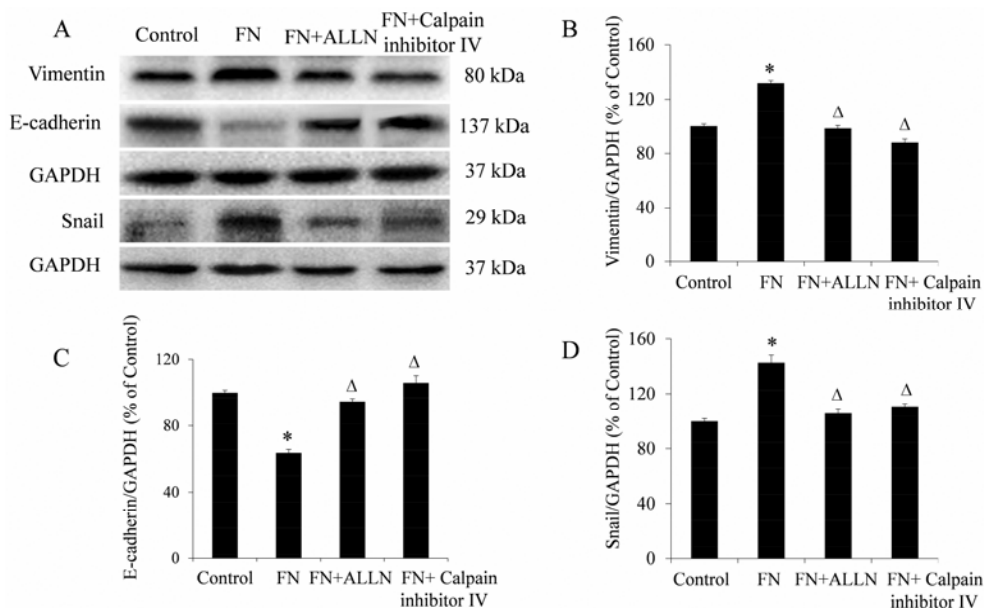


Figure 6 The effects of calpain inhibitors on vimentin, E-cadherin and snail protein expression of MCF-10A cells induced by FN. A: The representative photographs; B-D: The statistical analysis. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs FN

为细胞的恶变和转移提供了基础, 调控 EMT 的发生可能是防治肿瘤的一个靶点^[17]。乳腺肿瘤源于乳腺上皮细胞的恶变, 抑制乳腺上皮细胞 EMT 可能有效控制肿瘤细胞的侵袭和转移以及降低乳腺癌患者的死亡率。

Park 等^[4]研究证明, 乳腺肿瘤组织中的 FN 水平与肿瘤的恶性程度呈正相关, 与乳腺癌患者的存活率呈负相关。本研究发现 FN 能够诱导 MCF-10A 乳腺上皮细胞形态向间质细胞形态发生改变。此外, 通过划痕修复实验和 transwell 小室侵袭实验, 发现 FN 能够显著增强 MCF-10A 乳腺上皮细胞的迁移和侵袭能力。Western blot 法检测结果显示, FN 能够明显上调 MCF-10A 细胞中 vimentin 和 snail 的蛋白表达及明显下调 E-cadherin 的蛋白表达, 表明 FN 能够诱导乳腺上皮细胞发生间质转化。钙蛋白酶抑制剂通过模拟 calpain 底物结构, 竞争性地与 calpain 相互作用, 从而阻止 calpain 对底物的水解来发挥作用^[18]。Calpain 抑制剂是抗肿瘤药物开发的重要方向, 抑制 calpain 的活性可能会成为抑制肿瘤细胞转移的重要手段^[19]。Čáslavský 等^[20]研究证明, calpain 能使细胞从静态的上皮表型转变为具有运动和侵袭性的间质表型, 提示 calpain 表达增加及其活性的发挥可能在 EMT 中扮演着一个重要的角色。本研究发现 FN 能够使 MCF-10A 细胞中 calpain-2 蛋白表达上调。两种钙蛋白酶抑制剂 (ALLN 和 calpain inhibitor IV) 均能显著抑制 FN 诱导的 MCF-10A 细胞中 calpain-2 蛋白的表达, 并显著抑制细胞的形态变化、迁移和侵袭能力增强。此外, ALLN 和 calpain inhibitor IV 能够显著抑制 MCF-10A 细胞中 vimentin 和 snail 蛋白表达上调及 E-cadherin 蛋白表达下调。

综上所述, FN 能够诱导上皮细胞发生间质转化, 钙蛋白酶抑制剂 ALLN 和 calpain inhibitor IV 能够抑制 FN 诱导的乳腺上皮细胞 EMT, 有望应用于乳腺癌的预防。

References

- [1] Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 835–848.
- [2] Zhu T, Zhang X. Research progress on the role of epithelial-mesenchymal transition in pathogenesis of endometriosis [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* (浙江大学学报医学版), 2016, 45: 439–445.
- [3] Ma Y, Liu H, Zhang H, et al. The TGF- β signaling pathway induced EMT in breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2015, 50: 385–392.
- [4] Park J, Schwarzbauer JE. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 1649–1657.
- [5] Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritsier K, et al. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5555–5564.
- [6] Moon PG, Lee JE, Cho YE, et al. Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 40189–40199.
- [7] Storr SJ, Thompson N, Pu X, et al. Calpain in breast cancer: role in disease progression and treatment response [J]. *Pathobiology*, 2015, 82: 133–141.
- [8] Seinfeld J, Baudry N, Xu X, et al. Differential activation of calpain-1 and calpain-2 following kainate-induced seizure activity in rats and mice [J]. *eNeuro*, 2016, 3: ENEURO.0088-15.2016.
- [9] Igbal J, McRae S, Banaudha K, et al. Mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced osteopontin and its role in epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 36994–37009.
- [10] Keshamouni VG, Jagtap P, Michailidis G, et al. Temporal quantitative proteomics by iTRAQ 2D-LC-MS/MS and corresponding mRNA expression analysis identify post-transcriptional modulation of actin-cytoskeleton regulators during TGF- β -Induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8: 35–47.
- [11] Wang HJ, Shang DD, Zhu ZX, et al. The effects of fulvestrant on invasion ability and matrix metalloproteinase expression induced by estrogen in breast cancer cell MCF-7 [J]. *J Guiyang Med Coll (贵阳医学院学报)*, 2014, 39: 633–637.
- [12] Shang D, Li Z, Zhu Z, et al. Baicalein suppresses 17- β -estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33: 2077–2085.
- [13] Zhao XN, Sun ML, Wei MJ. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer stem cells [J]. *Prog Anat Sci (解剖科学进展)*, 2013, 19: 354–357.
- [14] He ZY, Wu SG, Peng F, et al. Up-regulation of RFC3 promotes triple negative breast cancer metastasis and is associated with poor prognosis via EMT [J]. *Transl Oncol*, 2016, 10: 1–9.
- [15] Comaills V, Kabeche L, Morris R, et al. Genomic instability is induced by persistent proliferation of cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Cell Rep*, 2016, 17: 2632–2647.

- [16] Yang MH, Chen CL, Chau GY, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 1464–1474.
- [17] El-Ghonaimy EA, Ibrahim SA, Youns A, et al. Secretome of tumor-associated leukocytes augment epithelial-mesenchymal transition in positive lymph node breast cancer patients *via* activation of EGFR/Tyr845 and NF- κ B/p65 signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 14333.
- [18] Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, et al. Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107: 1443–1452.
- [19] Mataga MA, Rosenthal S, Heerboth S, et al. Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitor [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32: 2523–2529.
- [20] Čáslavský J, Klímová Z, Vomastek T. ERK and RSK regulate distinct steps of a cellular program that induces transition from multicellular epithelium to single cell phenotype [J]. *Cell Signal*, 2013, 25: 2743–2751.