DOI:10.16016/j.1000-5404.202001179

Heregulin-β1 诱导硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

陈璟若[1],马雪娇[1,2],吕思楠[1],安琪尔[1],赵玉华[1] 610041 成都,四川大学:华西基础医学与法医学院生物化学与分子生物学教研室[1],华西药学院微生物与生化药学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨 heregulin-β1(HRG-β1)诱导硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl-CoA desaturase-1,SCD1)的表达及 SCD1 活性对乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法** 用 PBS(对照组)或不同浓度和作用时间下 HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测细胞 SCD1 mRNA 和蛋白表达。MTT 实验检测 HRG-β1 和 SCD1 抑制剂 A939572 处理后的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞增殖能力。划痕实验和 Transwell 实验分别检测 HRG-β1、A939572 和油酸(oleic acid,OA)处理后的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞迁移和侵袭能力。**结果** 用 HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,两种细胞的 SCD1 mRNA 和蛋白表达水平均增加,且均表现出时间-剂量依赖关系;与对照组比较,HRG-β1 处理后两种细胞的增殖率明显增加($P<0.01$),而加入 A939572 后,两种细胞的增殖率明显下降($P<0.01$);与对照组比较,HRG-β1 处理后 MCF7 和 SK-BR-3 细胞划痕迁移率和侵袭细胞数显著增加($P<0.01$)。HRG-β1 与 A939572 联用后,划痕迁移率和侵袭细胞数明显降低($P<0.01$),而回补 OA 后,划痕迁移率和侵袭细胞数均显著增加($P<0.01$)。**结论** HRG-β1 能上调 SCD1 的表达水平,且 HRG-β1 对乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 的增殖、迁移和侵袭的促进作用部分是由 SCD1 介导的。

[关键词] Heregulin-β1;硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1;乳腺癌;增殖;迁移;侵袭
[中图法分类号] R394.3; R73-37; R737.9 [文献标志码] A

Heregulin-β1 promotes proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by inducing stearoyl-CoA desaturase-1

CHEN Jingruo[1], MA Xuejiao[1,2], LYU Sinan[1], AN Qi'er[1], ZHAO Yuhua[1] [1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine; [2]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the heregulin-β1 (HRG-β1)-induced expression of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) and the effect of its activity of SCD1 on the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells MCF7 and SK-BR-3. **Methods** MCF7 and SK-BR-3 cells were treated with control (PBS) or HRG-β1 at different concentrations and for different times. Then RT-qPCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of SCD1. The wound healing assay and Transwell assay were employed to measure the migration and invasion of MCF7 and SK-BR-3 cells treated with PBS, HRG-β1, A939572 and oleic acid (OA). **Results** HRG-β1 increased both SCD1 mRNA and protein levels in MCF7 and SK-BR-3 cells at a time-dose dependent manner. Compared with the control group, HRG-β1 promoted cell proliferation in MCF7 and SK-BR-3 cells ($P<0.01$), while proliferation rate was decreased after A939572 treatment ($P<0.01$). Compared with the control group, HRG-β1 significantly increased the wound healing rates and invaded cell numbers of MCF7 and SK-BR-3 cells ($P<0.01$). The wound healing rates and invaded cell numbers of both cell lines were significantly decreased after HRG-β1 + A939572 treatment ($P<0.01$). The addition of OA rescued the migration and invasion of both cell lines which were

[通信作者] 赵玉华,E-mail: zhaoyh@scu.edu.cn

weakened by A939572 ($P<0.01$). **Conclusion** HRG-β1 can up-regulate the expression of SCD1, and the protein partially mediates the effect of HRG-β1 in promoting the proliferation, migration and invasion in MCF7 and SK-BR-3 cells.

[**Key words**] heregulin-β1; stearoyl-CoA desaturase-1; breast cancer; proliferation; migration; invasion

Corresponding author: ZHAO Yuhua, E-mail: zhaoyh@scu.edu.cn

Heregulin(HRG),又称 neuregulin,是一类激活酪氨酸激酶受体的 EGF 样生长因子。HRG 有 4 种亚型,其中有关 HRG1 的研究最多。HRG1 可以调节细胞增殖、分化、凋亡和迁移[1],在乳腺癌、胰腺癌、肺癌、结直肠癌和卵巢癌等多种人类癌症的发生、发展中起作用[2-3]。HRG1 的高表达与乳腺癌患者预后不良有关,多达 50%的人类乳腺肿瘤中发现 HRG1 表达增加[4]。HRG1 是多种组织中 ErbB3 和 ErbB4 的内源性配体。由 HRG1 介导的 ErbB2/ErbB3 异源二聚体在促进 HER2 阳性乳腺癌细胞增殖和细胞迁移中起重要作用[5]。HRG1 亚型分为 α、β 和 γ 三种,HRG-β1 与受体的亲和力最高[6],常选择 HRG-β1 用于研究。

研究表明,脂代谢异常在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用[7]。硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl-CoA desaturase-1,SCD1)催化饱和脂肪酸(saturated fatty acids,SFAs)转变为单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids,MUFAs),主要是将硬脂酸和棕榈酸催化形成油酸(oleic acid,OA)和棕榈油酸[8-9]。SCD1 在包括肺癌、肝癌、结直肠癌和乳腺癌等癌症中高表达,且 SCD1 及其催化产物在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用[10-14]。在乳腺癌中,SCD1 高表达患者的总生存期和无复发生存期短于 SCD1 低表达患者。因此,SCD1 可作为乳腺癌患者预后的指标[12]。但 HRG-β1 是否能影响乳腺癌细胞中 SCD1 的表达尚不清楚。本研究观察 HRG-β1 对脂代谢关键酶 SCD1 表达的影响,进而初步探讨 SCD1 酶活性在 HRG-β1 诱导的乳腺癌 MCF7 和 SK-BR-3 细胞增殖、迁移和侵袭中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞 MCF7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,人乳腺癌细胞 SK-BR-3 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12(1∶1)培养基、RPMI 1640 培养基、青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin,PS)、胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自以色列 Biological Industries 公司;蛋白标准品和 PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司;Heregulin-β1(HRG-β1)购自美国 Peprotech 公司;SCD1 抑制剂 A939572 购自美国 MedChemExpress 公司;油酸购自美国 Cayman 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒(RR360A)和 qPCR 试剂盒(RR820A)均购自日本 TaKaRa 公司。SCD1 和 β-actin 引物购自上海吉玛制药技术有限公司;SCD1 抗体购自美国 Abcam 公司;α-Tubulin 抗体、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 超敏化发光试剂盒以及辣根酶过氧化物酶标记的抗鼠和抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。MTT 试剂购自浙江 RUIBIO 公司,Matrigel 基底胶和 8 μm Transwell 细胞培养小室均购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 分别用含 10% FBS、1% PS 的 DMEM/F12 和 RPMI 1640 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2.2 HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞 取生长期的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,用胰酶消化重悬后接种于 6 孔板(MCF7 细胞数为 8×10^5 个/孔,SK-BR-3 细胞数为 3×10^5 个/孔),贴壁后,饥饿处理 8 h,分为两组进行实验。第 1 组,检测 HRG-β1 剂量对 SCD1 表达的影响:在铺入 MCF7 和 SK-BR-3 细胞的 6 孔板中加入 PBS(对照组)或不同浓度的 HRG-β1(2、10、20 ng/mL),对 MCF7 细胞处理 36 h,对 SK-BR-3 细胞处理 24 h。第 2 组,检测时间对 SCD1 表达的影响:在铺入 MCF7 和 SK-BR-3 细胞的 6 孔板中加入 HRG-β1(10 ng/mL),收集 HRG-β1 处理不同时间的 MCF7 细胞(0、12、24、36 h)和 SK-BR-3 细胞(0、6、12、24 h)。收集细胞,用于后续 RT-qPCR 实验和 Western blot 实验。

1.2.3 RNA 的提取和 qPCR 检测细胞 mRNA 表达 TRIzol 法提取总 RNA,测定 RNA 样品浓度,置于 -80 ℃保存。使用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转为 cDNA,随后进行 qPCR 实验。qPCR 使用的引物序列为:SCD1 上游 5′-CTCCACTGCTGGACATGAGA-3′,下游 5′-AATGAGTGAAGGGGCACAAC-3′;β-actin 上游 5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′,下游 5′-GGCG-

GCACCACCATGTACCCT-3′。PCR 反应条件:95 ℃,30 s;(预变性)95 ℃,5 s;60 ℃,30 s。PCR 反应共 40 个循环。重复实验 3 次。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 取对数生长期的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,用胰酶消化重悬后接种于 12 孔板(MCF7 细胞数为 4×10^5 个/孔,SK-BR-3 细胞数为 1.5×10^5 个/孔),处理方法同 1.2.2。按每孔上样量 35 μg 制备蛋白样品。在 80~100 V 条件下进行 SDS-PAGE 电泳 1.5 h 后,湿转电泳仪转至 0.2 μm PVDF 膜。转膜完成后,用含 5%的脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 1 h,1×TBST 洗膜 3 次。孵育 SCD1 一抗(稀释比为 1∶1 000),4 ℃,过夜。回收一抗,洗膜 3 次,室温孵育辣根酶过氧化物酶标记的二抗(稀释比为 1∶1 000),1 h,以 α-Tubulin 为内参,用 ECL 化学发光试剂盒检测目的条带。使用 Image Lab 软件拍照并用 Image J 软件进行灰度扫描,以目的条带与内参条带的灰度比值作为 SCD1 蛋白的相对表达量,重复实验 3 次。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖实验 取对数生长期的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,分别以 5 000 个细胞/孔接种于 96 孔板,贴壁后分别加入 PBS、HRG-β1(20 ng/mL)和 A939572(2 μmol/L),每组 3 个复孔。MCF7 细胞继续培养 72 h,SK-BR-3 细胞继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μL MTT 继续培养 4 h 后,再加入 150 μL DMSO,振荡,于 570 nm 波长下测量每孔光密度值[$D(570)$],以细胞的相对增殖率表示细胞增殖能力。细胞的相对增殖率 = $D(570)_{对照组}/D(570)_{实验组}\times100\%$,重复实验 3 次。

1.2.6 细胞划痕实验 取对数生长期的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,用胰酶消化重悬后,接种 MCF7 和 SK-BR-3 细胞于 6 孔板(MCF7 细胞数为 2×10^6 个/孔,SK-BR-3 细胞数为 1.5×10^6 个/孔),在细胞培养箱中贴壁培养 18 h 后进行划痕,然后加入含 1% FBS 的完全培养基,再分为 4 组:第 1 组加入 PBS(对照组);第 2 组加入 HRG-β1(20 ng/mL);第 3 组同时加入 HRG-β1(20 ng/mL)和 SCD1 抑制剂 A939572(2 μmol/L);第 4 组同时加入 HRG-β1(20 ng/mL)、SCD1 抑制剂 A939572(2 μmol/L)和油酸(oleic acid, OA, 50 μmol/L)。MCF7 细胞在划痕 0 h 和 48 h,SK-BR-3 细胞在 0 h 和 24 h 时,于显微镜(×100)下选取相同的 4 个视野进行拍照,并测量划痕宽度,细胞迁移能力用划痕迁移百分率表示,实验重复 3 次。划痕迁移百分率越高,细胞迁移能力越强。划痕迁移百分率=(初始划痕宽度−迁移后划痕宽度)/初始划痕宽度×100%。重复实验 3 次。

1.2.7 细胞侵袭实验 取对数生长期的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞,用胰酶消化重悬后接种于 4 个 12 孔板。贴壁后,饥饿处理 8 h,分别用 PBS、HRG-β1(20 ng/mL)、HRG-β1(20 ng/mL)和 A939572(2 μmol/L)联用以及 HRG-β1(20 ng/mL)、SCD1 抑制剂 A939572(2 μmol/L)和油酸(50 μmol/L)处理 12 h。在 Transwell 小室中铺入 100 μL Matrigel,包被 2 h。用胰酶消化细胞,无血清培养基重悬,取 200 μL 细胞(MCF7 细胞数为 1×10^5 个/室,SK-BR-3 细胞数为 2×10^5 个/室)接种至小室上室,下室加入 700 μL 含 20% FBS 的基础培养基,于 37 ℃细胞培养箱中继续培养,MCF7 细胞培养 48 h,SK-BR-3 细胞培养 24 h。取出小室,PBS 清洗后,固定染色,烘干。将烘干后的小室放于显微镜(×100)下随机选取 5 个视野观察拍照并细胞计数。以侵袭的细胞数表示细胞的侵袭能力,实验重复 3 次。

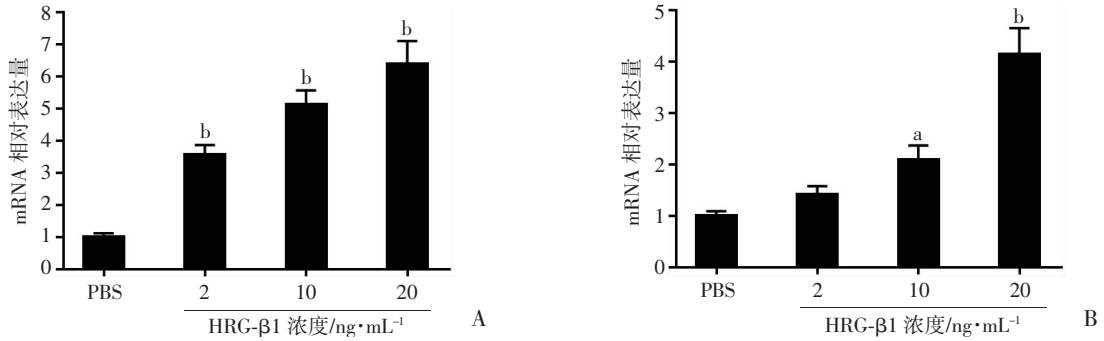
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

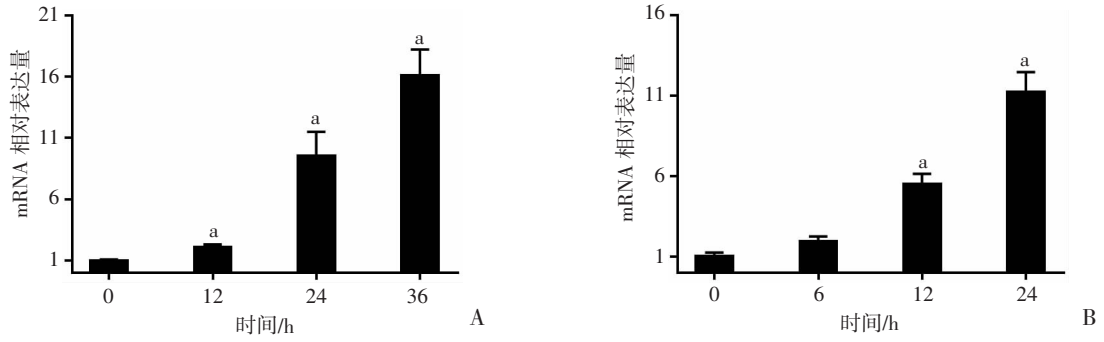
2.1 HRG-β1 对 MCF7 和 SK-BR-3 细胞 SCD1 mRNA 表达的影响

为了检测 HRG-β1 对 SCD1 mRNA 表达的诱导作用及是否具有剂量依赖性,分别用 PBS 和不同浓度 HRG-β1(2、10、20 ng/mL)处理 MCF736 h(图 1A)和 SK-BR-3 细胞 24 h(图 1B),HRG-β1 处理组 SCD1 mRNA 的相对表达量均较 PBS 对照组明显增加($P<0.05$)。而且在两种细胞中,随着 HRG-β1 浓度的增加,SCD1 mRNA 的表达量也随之增加(图 1)。为了检测 SCD1 mRNA 表达量是否随着 HRG-β1 处理时间变化而变化,用 10 ng/mL HRG-β1 处理 MCF7 细胞(图 2A),SCD1 mRNA 表达量在 12~36 h 持续上升,在 36 h 达到最高值;与 0 h 组比较,12、24、36 h 处理组差异均有统计学意义($P<0.01$)。用 10 ng/mL HRG-β1 处理 SK-BR-3 细胞(图 2B)后,SCD1 mRNA 表达量在 6~24 h 持续上升,在 24 h 达到最高值;与 0 h 组比较,6、12、24 h 处理组差异有统计学意义($P<0.01$)。而且在两种细胞中,随着 HRG-β1 处理时间的延长,SCD1 mRNA 的相对表达量也逐渐增加(图 2)。结果表明 HRG-β1 能明显上调 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中 SCD1 的 mRNA 水平,且 HRG-β1 对 SCD1 mRNA 表达的影响具有剂量和时间依赖性。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PBS 组比较; A:HRG-β1 处理 MCF7 细胞 36 h;B:HRG-β1 处理 SK-BR-3 细胞 24 h

图 1 不同浓度 HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞后 SCD1 mRNA 的表达变化



a:$P<0.01$,与 0 h 比较; A: MCF7 细胞;B: SK-BR-3 细胞

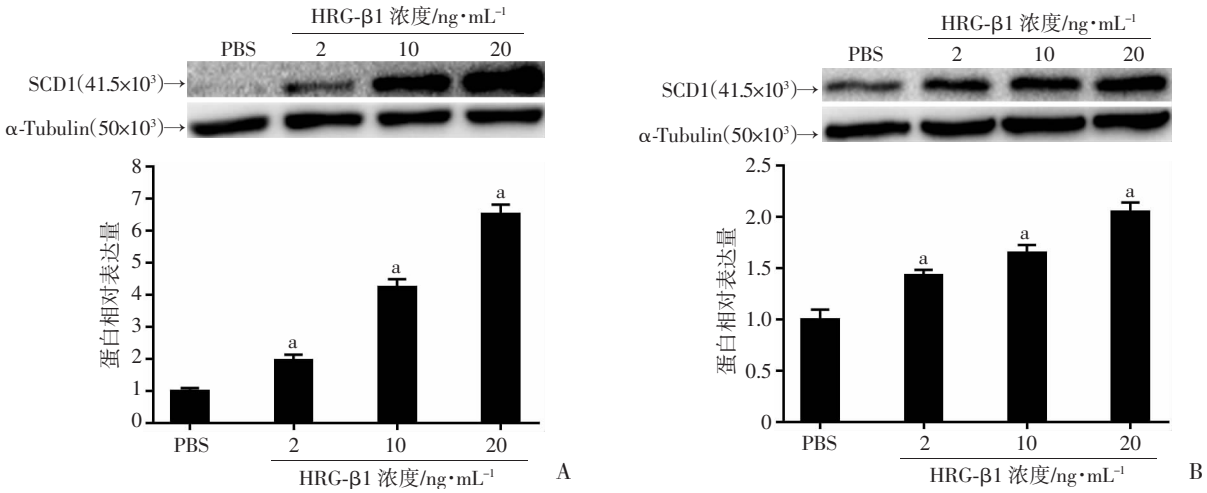
图 2 10 ng/mL HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞不同时间后 SCD1 mRNA 的表达变化

2.2 HRG-β1 对 MCF7 和 SK-BR-3 细胞 SCD1 蛋白表达的影响

为了检测 HRG-β1 对 SCD1 蛋白表达的诱导作用及是否具有剂量依赖性,分别用 PBS 和不同浓度(2、10、20 ng/mL)HRG-β1 处理 MCF736 h(图 3A)和 SK-BR-3 细胞 24 h(图 3B),HRG-β1 处理后 SCD1 蛋白表达量均较 PBS 组明显增加($P<0.01$)。而且在两种细胞中,随着 HRG-β1 浓度的增加,SCD1 蛋白的相对表达量也随之增加(图 3)。为了检测 SCD1 蛋白表达量是否随着 HRG-β1 处理时间变化而变化,用 10 ng/mL HRG-β1 处理 MCF7 细胞(图 4A),SCD1 蛋白表达量在 12~36 h 持续上升,在 36 h 达到最高值;与 0 h 比较,HRG-β1 处理 12、24、36 h 差异均有统计学意义($P<0.01$)。用 10 ng/mL HRG-β1 处理 SK-BR-3 细胞(图 4B)后,SCD1 蛋白表达量在 6~24 h 持续上升,在 24 h 达到最高值;与 0 h 比较,HRG-β1 处理 6、12、24 h 差异有统计学意义($P<0.01$)。而且在两种细胞中,随着 HRG-β1 处理时间的延长,SCD1 蛋白的相对表达量也逐渐增加(图 4)。结果表明,在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中,HRG-β1 能明显上调 SCD1 的蛋白水平,且 HRG-β1 对 SCD1 蛋白表达的影响具有剂量和时间依赖性。

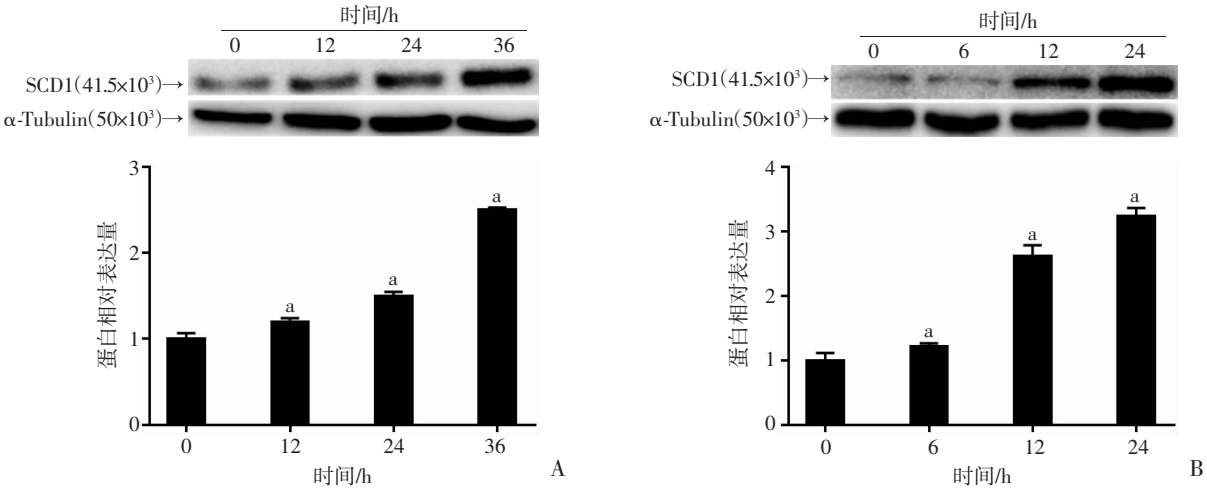
2.3 HRG-β1 和 SCD1 抑制剂 A939572 对细胞增殖能力的影响

在两种细胞中分别加入 PBS、HRG-β1 和 HRG-β1+A939572 后检测细胞增殖,MCF7 细胞(图 5A)处理 72 h,SK-BR-3 细胞(图 5B)处理 48 h。与 PBS 组比较,两种细胞中 HRG-β1 组细胞增殖率均显著增加($P<0.01$)。与 HRG-β1 组比较,HRG-β1+A939572 组细胞增殖率明显降低($P<0.01$)。结果表明,SCD1 抑制剂能抑制由 HRG-β1 介导的乳腺癌 MCF7 和 SK-BR-3 细胞的增殖能力。



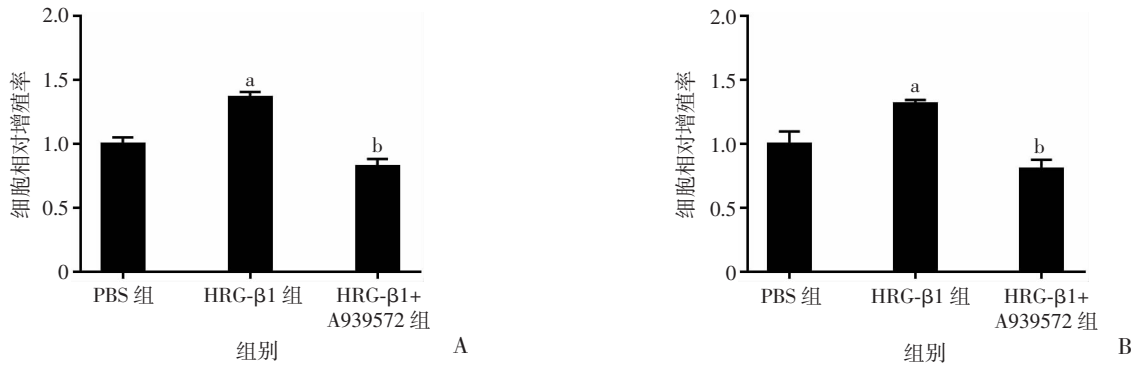
a:$P<0.01$,与 PBS 组比较; A:Western blot 检测 HRG-β1 处理 MCF7 细胞 36 h 后 SCD1 蛋白表达及半定量分析; B:Western blot 检测 HRG-β1 处理 SK-BR-3 细胞 24 h 后 SCD1 蛋白表达及半定量分析

图 3 不同浓度 HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞后 SCD1 蛋白的表达变化



a:$P<0.01$, 与 0 h 比较; A:Western blot 检测 HRG-β1 处理 MCF7 细胞后 SCD1 蛋白表达及半定量分析;B:Western blot 检测 HRG-β1 处理 SK-BR-3 细胞后 SCD1 蛋白表达及半定量分析

图 4 10 ng/mL HRG-β1 处理 MCF7 和 SK-BR-3 细胞不同时间后 SCD1 蛋白的表达变化



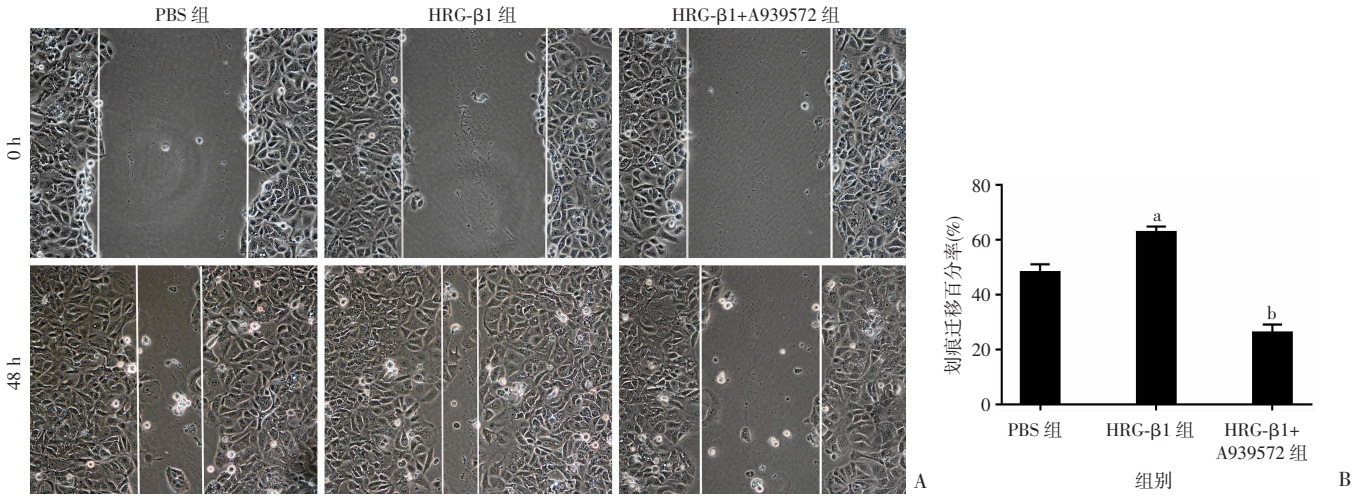
a:$P<0.01$,与 PBS 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较; A:MCF7 细胞处理 72 h;B:SK-BR-3 细胞处理 48 h

图 5 HRG-β1 和 SCD1 抑制剂 A939572 对细胞增殖能力的影响

2.4　SCD1 抑制剂 A939572 和 SCD1 催化产物油酸对 HRG-β1 诱导细胞迁移能力的影响

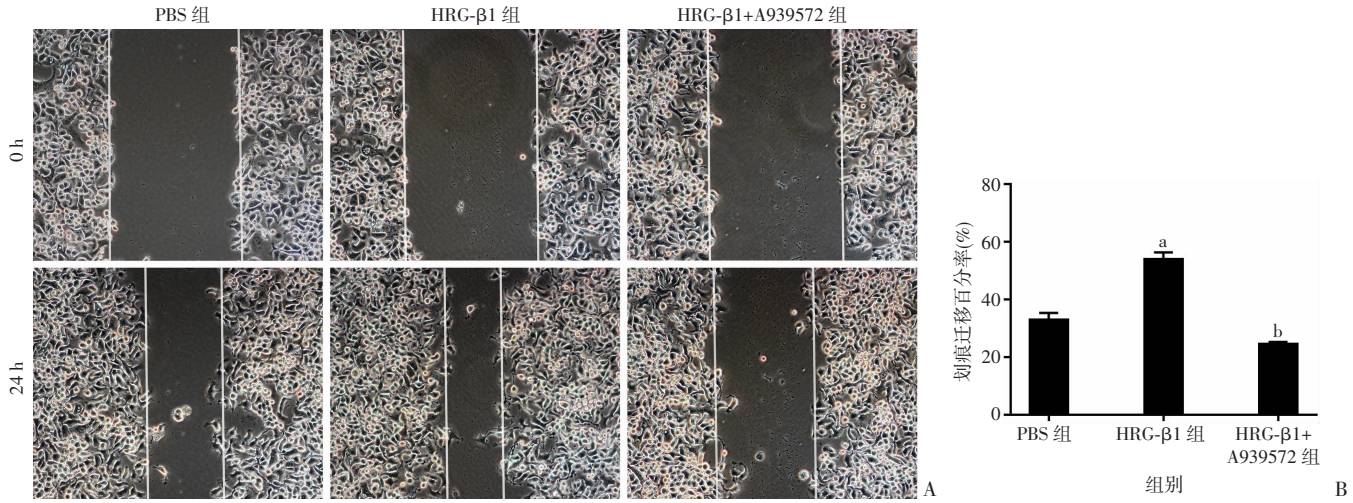
MCF7 细胞划痕 48 h 后,与 PBS 组相比,HRG-β1 组细胞划痕迁移率明显增加($P<0.01$,图 6);SK-BR-3 细胞划痕 24 h 后,与 PBS 组相比,HRG-β1 组细胞划痕迁移率明显增加($P<0.01$,图 7),说明 HRG-β1 能促进乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 的迁移能力。与 HRG-β1 组相比,HRG-β1 和 A939572 联用组两种细胞的划痕迁移率明显降低($P<0.01$),说明 SCD1 抑制剂 A939572 能逆转 HRG-β1 诱导的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞迁移。

进一步检测了回补 SCD1 的催化产物油酸(OA)对细胞迁移能力的影响。MCF7 细胞划痕 48 h 后,与 HRG-β1 和 A939572 联用组相比,回补油酸组细胞划痕迁移率明显增加($P<0.01$,图 8);SK-BR-3 细胞划痕 24 h 后,与 HRG-β1 和 A939572 联用组相比,回补油酸组细胞划痕迁移率明显增加($P<0.01$,图 9)。说明油酸能逆转 A939572 对乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 迁移能力的抑制作用,提示 SCD1 的催化活性对 HRG-β1 诱导的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞迁移能力有关键作用。



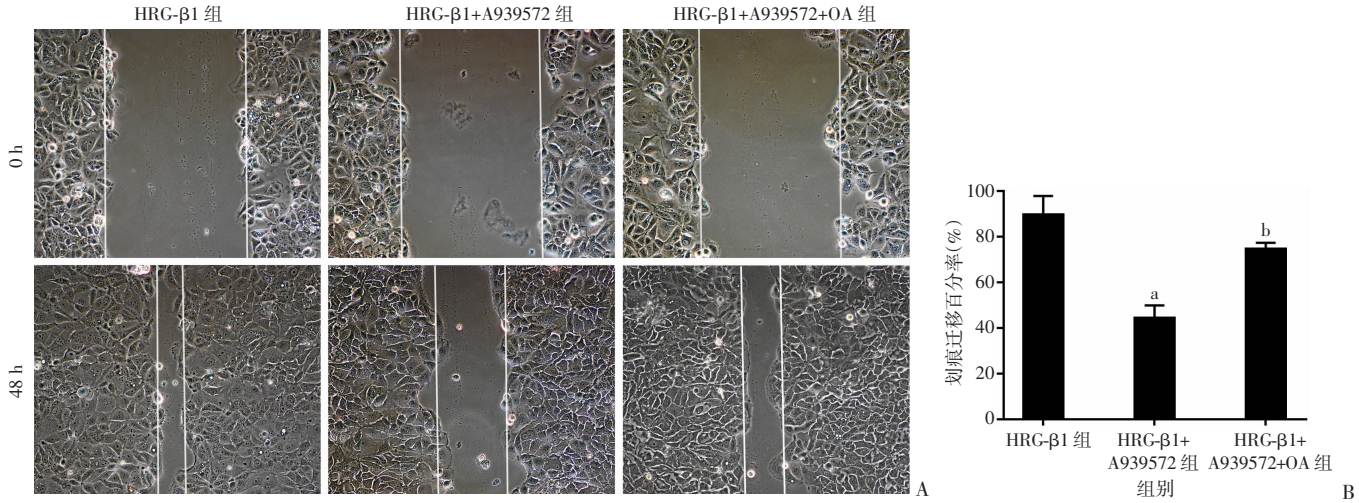
A:各组处理后 MCF7 细胞迁移情况(×100);B:各组细胞划痕迁移百分率　a:$P<0.01$,与 PBS 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较

图 6　划痕实验观测 SCD1 抑制剂 A939572 逆转 HRG-β1 诱导的 MCF7 细胞迁移



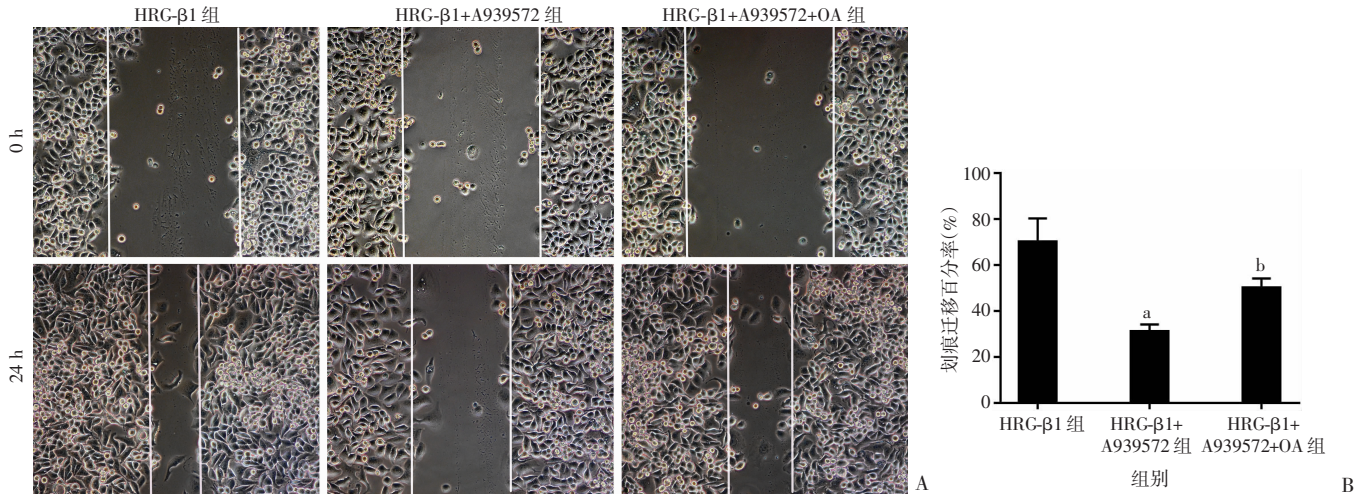
A:各组处理后 SK-BR-3 细胞迁移情况(×100);B:各组细胞划痕迁移百分率　a:$P<0.01$,与 PBS 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较

图 7　划痕实验观测 SCD1 抑制剂 A939572 逆转 HRG-β1 诱导的 SK-BR-3 细胞迁移



A:各组处理后 MCF7 细胞迁移情况(×100);B:各组细胞划痕迁移百分率 a:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1+A939572 组比较

图 8 划痕实验观测油酸回补 A939572 对 MCF7 细胞迁移的抑制作用

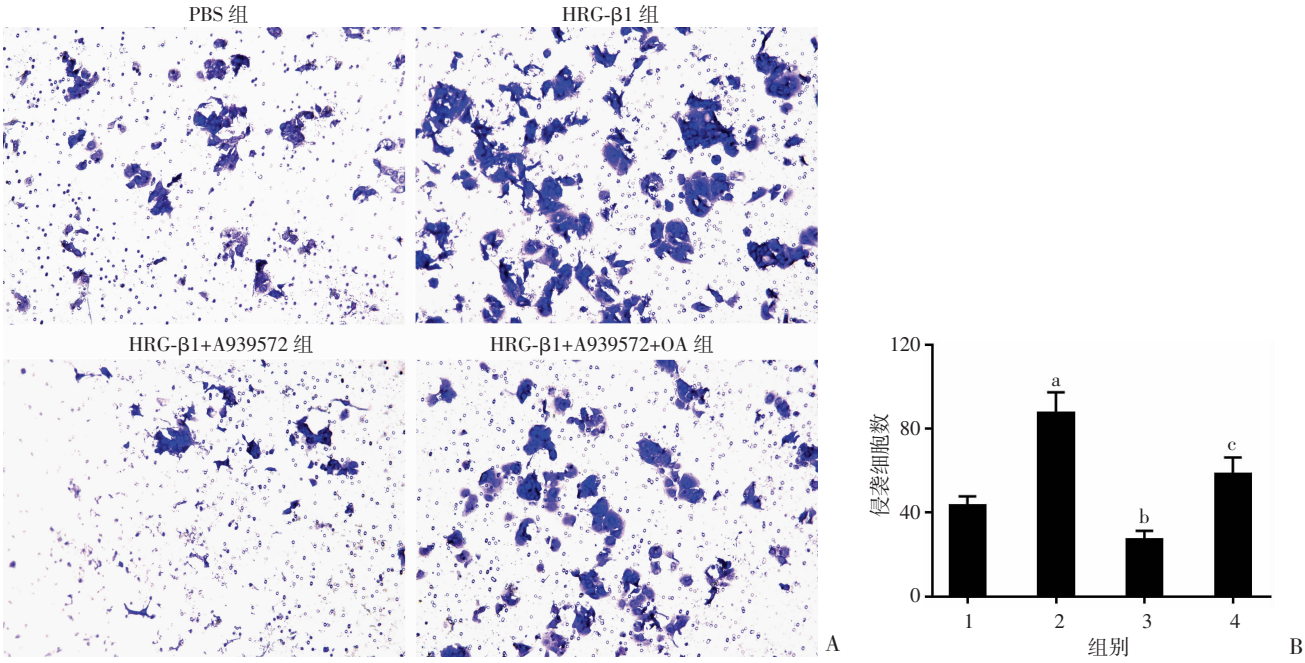


A:各组处理后 SK-BR-3 细胞迁移情况(×100);B:各组细胞划痕迁移百分率 a:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1+A939572 组比较

图 9 划痕实验观测油酸回补 A939572 对 SK-BR-3 细胞迁移的抑制作用

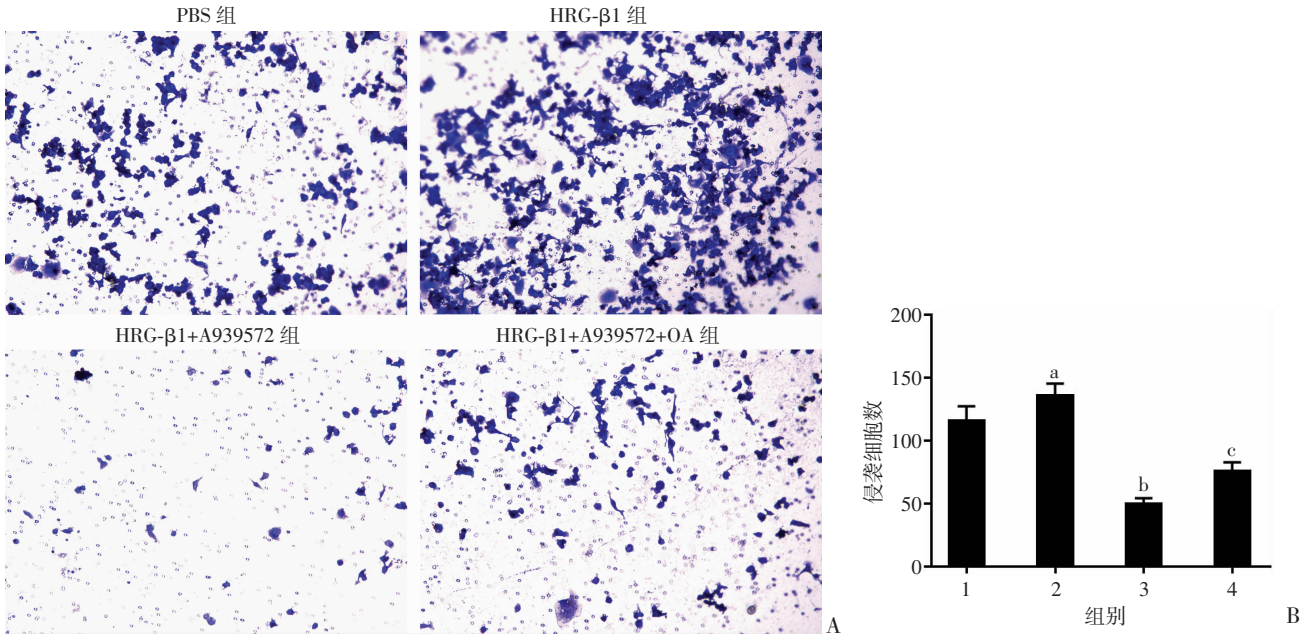
2.5 SCD1 抑制剂 A939572 和 SCD1 催化产物油酸对 HRG-β1 诱导细胞侵袭能力的影响

如图 10 所示,MCF7 细胞侵袭 48 h 后,与 PBS 组相比,HRG-β1 组侵袭细胞数明显增加($P<0.01$);与 HRG-β1 和 A939572 联用组相比,回补油酸组侵袭细胞数明显增加($P<0.01$)。如图 11 所示,SK-BR-3 细胞侵袭 24 h 后,与 PBS 组相比,HRG-β1 组侵袭细胞数明显增加($P<0.05$);与 HRG-β1 组相比,HRG-β1 和 A939572 联用组侵袭细胞数明显降低($P<0.01$);与 HRG-β1 和 A939572 联用组相比,回补油酸组侵袭细胞数明显增加($P<0.01$)。结果表明 SCD1 的活性对 HRG-β1 诱导的 MCF7 和 SK-BR-3 细胞侵袭能力有重要作用。



A:各组处理后 MCF7 细胞侵袭情况(×100);B:各组侵袭细胞数 1:PBS 组;2:HRG-β1 组;3:HRG-β1+A939572 组;4:HRG-β1+A939572+OA 组; a:$P<0.01$,与 PBS 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较;c:$P<0.01$,与 HRG-β1+A939572 组比较

图 10 Transwell 检测 A939572 和油酸对 MCF7 细胞侵袭的影响



A:各组处理后 SK-BR-3 细胞侵袭情况(×100);B:各组侵袭细胞数 1:PBS 组;2:HRG-β1 组;3:HRG-β1+A939572 组;4:HRG-β1+A939572+OA 组; a:$P<0.05$,与 PBS 组比较;b:$P<0.01$,与 HRG-β1 组比较;c:$P<0.01$,与 HRG-β1+A939572 组比较

图 11 Transwell 检测 A939572 和油酸对 SK-BR-3 细胞侵袭的影响

3 讨论

脂代谢异常是肿瘤代谢的特征之一。已有多项研究表明,肿瘤细胞可以合成大量的 SFAs 和 MUFAs 用以合成新的脂类。这些脂类一方面作为合成细胞膜的原材料,另一方面可以参与肿瘤细胞中生长和耐药相关的信号转导[15],所以很多脂类生成相关基因都在肿瘤细胞中具有较高的表达水平。近几年的研究发现,调控脂类合成的关键分子 SCD1 在包括卵巢癌、肺癌、乳腺癌等癌症中高表达,且能促进细胞的迁移侵袭能力[11,16-17]。在乳腺癌细胞中,SCD1 的表达水平下调能明显抑制 β-catenin 信号通路,从而抑制细胞的增殖和迁移侵袭能力[17]。因此,SCD1 在乳腺癌的发生发展中起着重要作用,深入研究 SCD1 对治疗乳腺癌具有重要意义。

HRG1 是一种致癌基因。HRG1 主要通过激活 ErbB 酪氨酸激酶受体蛋白家族来发挥其生物学功能[18]。ErbB 酪氨酸激酶受体蛋白家族有 4 个成员 ErbB1(EGFR)、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4。HRG1 包含一个表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)样结构域。它与 ErbB3 和 ErbB4 受体结合,诱导 ErbB3 和 ErbB2 或 ErbB4 和 ErbB2 之间的异二聚化,从而激活 ErbB2 下游信号通路,最终影响细胞的增殖、迁移和侵袭[6]。例如,HRG1 能诱导肌动蛋白细胞骨架重组和细胞迁移[19]。HRG-β1 能激活 YAP 信号通路,促进乳腺癌细胞的迁移[20]。HRG-β1 能通过诱导 GPR30 蛋白表达,从而促进乳腺癌细胞 MCF7 迁移和侵袭[21]。HRG-β1 能通过诱导肿瘤坏死因子受体超家族成员 Fn14 表达,从而促进乳腺癌细胞迁移和侵袭[22]。YAMASHITA 等[5]的研究也表明,HRG-β1 能促进乳腺癌细胞中芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)的表达,进而影响细胞的迁移侵袭能力。以上研究结果均表明 HRG1 在乳腺癌中发挥着重要作用,因此有必要深入研究探讨 HRG1 在影响乳腺癌发生发展中的具体机制。

ZHANG 等[23]的研究表明,EGFR 介导的 SCD1 第 55 位酪氨酸磷酸化能维持 SCD1 蛋白的稳定性,增加细胞内 MUFA 水平,从而促进肺癌的生长。而 EGFR 属 ErbB 家族成员,HRG-β1 能激活该家族,我们由此假设 HRG-β1 与 SCD1 有一定联系。本研究采用同时表达 ErbB2、ErbB3 和 SCD1 的乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3,结果表明,在两种乳腺癌细胞系中,HRG-β1 均能明显上调 SCD1 的 mRNA 和蛋白水平。研究表明,在乳腺癌细胞中 HRG-β1 能通过 PI3K/AKT-Snail 信号通路促进 EMT 过程,从而促进乳腺癌的转移[24]。另有研究表明,在哺乳动物中 PI3K/AKT 信号通路能激活胆固醇调节元件结合蛋白 1(sterol-regulatory element binding protein 1,SREBP1)[25],而 SREBP1 是 SCD1 的主要转录调控因子[26]。因此,HRG-β1 可能通过 PI3K/AKT-SREBP1 信号通路来上调 SCD1 的表达,但该机制有待实验证明。

我们实验室前期的研究证明,HRG-β1 能诱导糖酵解过程进而促进乳腺癌细胞 MCF7 的迁移能力[27]。因此,本研究进一步探讨 HRG-β1 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的促进作用是否与 SCD1 有关。结果表明,加入 SCD1 抑制剂 A939572 后能抑制由 HRG-β1 促进的细胞增殖、迁移和侵袭能力,而回补 SCD1 催化产物油酸能逆转 A939572 对细胞迁移和侵袭能力的抑制作用。结果证明 HRG-β1 能通过促进 SCD1 的活性,影响乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

综上所述,本研究显示,在乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 中,HRG-β1 可以诱导 SCD1 mRNA 和蛋白表达,对乳腺癌细胞 MCF7 和 SK-BR-3 增殖、迁移和侵袭的促进作用是由 SCD1 介导的。该发现为进一步研究 HRG-β1 和 SCD1 在乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] BREULEUX M. Role of heregulin in human cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(18): 2358-2377. DOI:10.1007/s00018-007-7120-0.

[2] FALLS D L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies[J]. Exp Cell Res, 2003, 284(1): 14-30. DOI:10.1016/s0014-4827(02)00102-7.

[3] NAGASAKA M, OU S I. Neuregulin 1 Fusion-positive NSCLC[J]. J Thorac Oncol, 2019, 14(8): 1354-1359. DOI:10.1016/j.jtho.2019.05.015.

[4] DE ALAVA E, OCAÑA A, ABAD M, *et al*. Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(19): 2656-2663. DOI:10.1200/JCO.2006.08.6850.

[5] YAMASHITA N, SAITO N, ZHAO S, *et al*. Heregulin-induced cell migration is promoted by aryl hydrocarbon receptor in HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2018, 366(1): 34-40. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.02.033.

[6] ZUO B L, YAN B, ZHENG G X, *et al*. Targeting and suppression of HER3-positive breast cancer by T lymphocytes expressing a heregulin chimeric antigen receptor[J]. Cancer Immunol Immunother, 2018, 67(3): 393-401. DOI:10.1007/s00262-017-2089-5.

[7] MENENDEZ J A, LUPU R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(10): 763-777. DOI:10.1038/nrc2222.

[8] ALJOHANI A M, SYED D N, NTAMBI J M. Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(12): 831-842. DOI:10.1016/j.tem.2017.10.003.

[9] TRACZ-GASZEWSKA Z, DOBRZYN P. Stearoyl-CoA desaturase 1 as a therapeutic target for the treatment of cancer[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(7): E948. DOI:10.3390/cancers11070948.

[10] MERINO SALVADOR M, GÓMEZ DE CEDRÓN M, MORENO RUBIO J, *et al*. Lipid metabolism and lung cancer [J]. Crit Rev Oncol, 2017, 112: 31-40. DOI:10.1016/j.critrevonc.2017.02.001.

[11] LIU G H, FENG S, JIA L, *et al*. Lung fibroblasts promote metastatic colonization through upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1 in tumor cells[J]. Oncogene, 2018, 37(11): 1519-1533. DOI:10.1038/s41388-017-0062-6.

[12] HOLDER A M, GONZALEZ-ANGULO A M, CHEN H Q, *et al*. High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137(1): 319-327. DOI:10.1007/s10549-012-2354-4.

[13] RAN H, ZHU Y M, DENG R Y, *et al*. Stearoyl-CoA desaturase-1 promotes colorectal cancer metastasis in response to glucose by suppressing PTEN[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 54. DOI:10.1186/s13046-018-0711-9.

[14] 李卫华, 杨佳欣. 硬脂酰辅酶A去饱和酶1与恶性肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(17): 1131-1134. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.20140483.
LI W H, YANG J X. Development in the study of the correlation between stearoyl-coenzyme A desaturase 1 and cancer progression[J]. Chin J Clin Oncol, 2014, 41(17): 1131-1134. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.20140483.

[15] SHE K L, FANG S H, DU W, *et al*. SCD1 is required for EGFR-targeting cancer therapy of lung cancer *via* re-activation of EGFR/PI3K/AKT signals[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 103. DOI:10.1186/s12935-019-0809-y.

[16] ZHAO G, CARDENAS H, MATEI D. Ovarian cancer-why lipids matter[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(12): 1870. DOI: 10.3390/cancers11121870.

[17] MAUVOISIN D, CHARFI C, LOUNIS A M, *et al*. Decreasing stearoyl-CoA desaturase-1 expression inhibits β-catenin signaling in breast cancer cells[J]. Cancer Sci, 2013, 104(1): 36-42. DOI:10.1111/cas.12032.

[18] KATARIA H, ALIZADEH A, KARIMI-ABDOLREZAEE S. Neuregulin-1/ErbB network: an emerging modulator of nervous system injury and repair[J]. Prog Neurobiol, 2019, 180: 101643. DOI:10.1016/j.pneurobio.2019.101643.

[19] HIJAZI M M, THOMPSON E W, TANG C, *et al*. Heregulin regulates the actin cytoskeleton and promotes invasive properties in breast cancer cell lines[J]. Int J Oncol, 2000, 17(4): 629-641. DOI:10.3892/ijo.17.4.629.

[20] HASKINS J W, NGUYEN D X, STERN D F. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration[J]. Sci Signal, 2014, 7(355): ra116. DOI:10.1126/scisignal.2005770.

[21] RUAN S Q, WANG S W, WANG Z H, *et al*. Regulation of HRG-β1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(1): 131-138. DOI:10.3892/mmr.2012.874.

[22] ASRANI K, KERI R A, GALISTEO R, *et al*. The HER2- and heregulin β1 (HRG)-inducible TNFR superfamily member Fn14 promotes HRG-driven breast cancer cell migration, invasion, and MMP9 expression[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(4): 393-404. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-12-0542.

[23] ZHANG J Q, SONG F, ZHAO X J, *et al*. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 127. DOI:10.1186/s12943-017-0704-x.

[24] CHENG L S, ZHA Z, LANG B, *et al*. Heregulin-beta1 promotes metastasis of breast cancer cell line SKBR3 through upregulation of Snail and induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2009, 280(1): 50-60. DOI:10.1016/j.canlet.2009.02.007.

[25] PORSTMANN T, SANTOS C R, GRIFFITHS B, *et al*. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth[J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 224-236. DOI:10.1016/j.cmet.2008.07.007.

[26] GRIFFITHS B, LEWIS C A, BENSAAD K, *et al*. Sterol regulatory element binding protein-dependent regulation of lipid synthesis supports cell survival and tumor growth[J]. Cancer Metab, 2013, 1(1): 3. DOI:10.1186/2049-3002-1-3.

[27] 蒋素芳, 屠凯岭, 周兰, 等. Heregulin-β1诱导的糖酵解对乳腺癌细胞MCF7迁移的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2016, 47(4): 463-467. DOI:10.13464/j.scuxbyxb.2016.04.003.
JIANG S F, TU K L, ZHOU L, *et al*. Heregulin-β1-induced glycolysis promotes migration of breast cancer cell line MCF7[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2016, 47(4): 463-467. DOI:10.13464/j.scuxbyxb.2016.04.003.

(**收稿**:2020-01-20;**修回**:2020-03-12)

(编辑 汪勤俭)