

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 06. 001

跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在乳腺癌细胞 MCF-7 中影响 细胞侵袭和转移的作用机制*

李明亮,赵建英,田 笑[△],栾 亮,刘 静,蔡 婧
北部战区总医院检验科,辽宁沈阳 110016

摘 要:目的 研究跨膜丝氨酸蛋白酶 4(TMPRSS4)在乳腺癌的发生和发展,以及侵袭和转移中所发挥的生物学作用,旨在为乳腺癌的诊断和治疗找到新的靶点和理论依据。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)和 Western blot 检测乳腺癌细胞中 TMPRSS4 的 mRNA 和蛋白表达水平;通过慢病毒转染乳腺癌细胞,干涉 TMPRSS4 表达水平,采用 qPCR 和 Western blot 检测干涉效果;采用细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测乳腺癌细胞转染前后细胞转移和侵袭能力的改变情况。结果 TMPRSS4 在多种乳腺癌细胞中的 mRNA 和蛋白水平均呈高表达;慢病毒转染后,TMPRSS4 在 MCF-7 细胞中的 mRNA 和蛋白表达水平均明显下降;且慢病毒转染后,MCF-7 细胞的转移和侵袭能力与未转染 MCF-7 细胞和不含干涉片段的病毒转染 MCF-7 细胞比较均明显减弱。结论 TMPRSS4 在乳腺癌细胞中呈高表达,并且能够增强乳腺癌 MCF-7 细胞的转移和侵袭能力。

关键词:跨膜丝氨酸蛋白酶 4; 乳腺癌; 侵袭; 转移
中图法分类号:R737. 9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)06-0721-05

Mechanism of transmembrane serine protease 4 affecting cell invasion and metastasis in breast cancer cell MCF-7*

LI Mingliang,ZHAO Jianying,TIAN Xiao[△],LUAN Liang,LIU Jing,CAI Jing
Department of Clinical Laboratory,General Hospital of Northern Theater
Command,Shenyang,Liaoning 110016,China

Abstract: Objective To study the biological role of transmembrane serine protease 4 (TMPRSS4) in the occurrence and development of breast cancer,as well as invasion and metastasis,in order to find new targets and theoretical basis for the diagnosis and treatment of breast cancer. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of TMPRSS4 in breast cancer cell. Breast cancer cell were transfected with lentivirus to interfere with the expression level of TMPRSS4,and qPCR and Western blot were used to detect the interference effect. The changes of cell metastasis and invasion ability of breast cancer cells before and after transfection were detected by cell scratch assay and Transwell chamber assay. **Results** TMPRSS4 mRNA and protein levels were highly expressed in various breast cancer cells. After lentiviral transfection,the mRNA and protein expression levels of TMPRSS4 were significantly decreased in MCF-7 cells. And after lentivirus transfection,the metastasis and invasion ability of MCF-7 cells were significantly weakened compared with untransfected MCF-7 cell and virus-transfected MCF-7 cell without interference fragments. **Conclusion** TMPRSS4 is highly expressed in breast cancer cell and could promote the metastasis and invasion ability of breast cancer MCF-7 cells.

Key words: transmembrane serine protease 4; breast cancer; invasion; metastasis

乳腺癌是全球范围内女性最常见的肿瘤之一,同时也是女性肿瘤相关死亡的第二大原因^[1]。尽管目前

前在乳腺癌早期诊断和治疗中取得了明显成效,但乳腺癌的高发病率和高病死率仍引起全球广泛关注,并

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(20180551178)。
作者简介:李明亮,男,主管技师,主要从事肿瘤免疫方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:smile994016@163. com。
本文引用格式:李明亮,赵建英,田笑,等.跨膜丝氨酸蛋白酶 4 在乳腺癌细胞 MCF-7 中影响细胞侵袭和转移的作用机制[J]. 检验医学与临床,2022,19(6):721-725.

且乳腺癌的各种不良预后绝大部分源于肿瘤的复发和转移^[2-3]。因此,研究乳腺癌的侵袭和转移机制并寻找新的治疗靶点十分重要。跨膜丝氨酸蛋白酶 4 (TMPRSS4)是Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶家族中的一员,TMPRSS4 水平可在多种肿瘤中呈高表达,包括胰腺癌、胃癌、结直肠癌等,由于其具有胰酶活性,可能在肿瘤的转移和侵袭过程中起重要作用^[4]。近年来有研究表明,TMPRSS4 参与多种肿瘤细胞的转移和侵袭,包括前列腺癌、肺癌^[5]和肝癌^[6]等。近期有研究表明,TMPRSS4 水平在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中呈高表达且通过上皮细胞间充质化(EMT)进程调控肿瘤的转移和侵袭^[7]。MCF-7 细胞是常见的雌激素受体阳性的人乳腺癌细胞,TMPRSS4 在乳腺癌 MCF-7 细胞中的生物学作用及分子机制尚不清楚。本研究不仅检测了 TMPRSS4 在 MCF-7 细胞中的表达情况,还通过干扰其表达水平探讨其在肿瘤发生和发展中的生物学功能,为寻找乳腺癌治疗的新靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 材料 人正常乳腺细胞 HBL-100,MCF-7、ZR-75-1、ZR-75-30 3 种乳腺癌细胞,所有细胞株均来源于中国医科大学遗传学教研室。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 中国杭州博日科技有限公司聚合酶链反应(PCR)扩增仪,美国罗氏公司实时荧光定量 PCR (qPCR)扩增仪 Light Cycler,美国阿尔法公司电泳凝胶成像分析系统,美国 Bio-Rad 凝胶电泳仪,日本奥林巴斯倒置相差显微镜。

1.2.2 试剂 MEM 培养基(美国 Gibco 公司),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(日本 Takara 公司),qPCR 试剂盒(日本 Takara 公司),BCA 蛋白含量检测试剂盒(中国南京凯基生物科技发展有限公司),兔抗人 TMPRSS4 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),Transwell 小室(美国 Corning 公司),实验所用慢病毒购于上海吉满生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人正常乳腺细胞 HBL-100、乳腺癌细胞 MCF-7 在细胞常规条件下培养,正常换液和

传代,待细胞长满瓶底后,选取生长状态良好的细胞冻存备用。

1.3.2 qPCR 采用 Trizol 法提取总 RNA,采用紫外分光光度计检测标本 RNA 浓度和纯度,以 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 提示标本满足要求。按反转录试剂盒操作说明书反转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增分析,引物委托上海吉满生物科技有限公司合成,扩增体系 50 μL: Taq 酶 1 μL、Taq buffer 5 μL、MgCl₂ 3 μL、dNTP 1 μL、上下游引物各 1 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 37 μL。扩增条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 60 s,共 40 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳,采用 Bio-Rad 分析系统扫描分析,TMPRSS4 基因表达水平= TMPRSS4 基因 A 值/β-actinA 值。

1.3.3 Western blot 按照 BCA 试剂盒说明书提取总蛋白,然后进行 Western blot。电泳条件:浓缩胶 80 V,分离胶 100 V,时间 1.5 h;转膜条件:200 mA,时间 2 h。显色成像后用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.3.4 慢病毒转染 MCF-7 细胞 慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒为基础改造得到的基因治疗载体,慢病毒转染后可以使目的基因整合到细胞染色体中,并且稳定、持久地表达。本实验用包含有 TMPRSS4 干涉片段基因的慢病毒包装质粒转染 MCF-7 细胞,从而获得病毒包装后的重组慢病毒载体,由上海吉满生物科技有限公司构建。实验共设 3 组,分别为含 TMPRSS4 干涉片段的慢病毒转染 MCF-7 细胞(LV-TMPRSS4-RNAi 组),不含 TMPRSS4 干涉片段的慢病毒转染 MCF-7 细胞(NC 组),未用慢病毒转染的 MCF-7 细胞(Control 组)。先根据病毒与细胞数量比值(MOI)不同分组,通过预实验确定慢病毒感染细胞的 MOI 和最佳感染条件。制备含 50 μg/mL Polybrene 的培养基 P(M),含 50 μg/mL Polybrene 的 ENI.S 感染增强溶液 P(E)各 200 μL。按表 1 加入相应溶液形成 A、B、C、D 4 种条件,混匀培养,转染 72 h 后,采用荧光显微镜观察感染效率,感染效率 80%以上作为转染最佳条件,正式转染时使用。

表 1 慢病毒转染最佳条件的确定

MOI	Control	A	B	C	D
100	培养基 100 μL	培养基 90 μL	培养基 80 μL	ENI.S 90 μL	ENI.S 80 μL
		病毒液 10 μL	P(M)10 μL	病毒液 10 μL	P(E)10 μL
			病毒液 10 μL		病毒液 10 μL
10	培养基 100 μL	培养基 90 μL	培养基 80 μL	ENI.S 90 μL	ENI.S 80 μL

续表 1 慢病毒转染最佳条件的确定

MOI	Control	A	B	C	D
1	培养基 100 μL	病毒液 10 μL	P(M)10 μL	病毒液 10 μL	P(E)10 μL
			病毒液 10 μL		病毒液 10 μL
		培养基 90 μL	培养基 80 μL	ENI. S 90 μL	ENI. S 80 μL
		病毒液 10 μL	P(M)10 μL	病毒液 10 μL	P(E)10 μL
			病毒液 10 μL		病毒液 10 μL

1.3.5 转移和侵袭实验 根据文献[6]介绍的方法进行划痕实验及制备细胞侵袭模型。将细胞悬液接种于六孔板中,待细胞融合接近 100%时,用中枪头划痕,用磷酸盐缓冲液清洗细胞后,在无胎牛血清培养基上继续培养,分别于 0、24 h 后拍照,观察细胞转移能力。用基质胶包被 Transwell 上室,制备侵袭模型。常规培养 24 h 后,用结晶紫染液染色后于显微镜下观察细胞侵袭能力的变化情况。

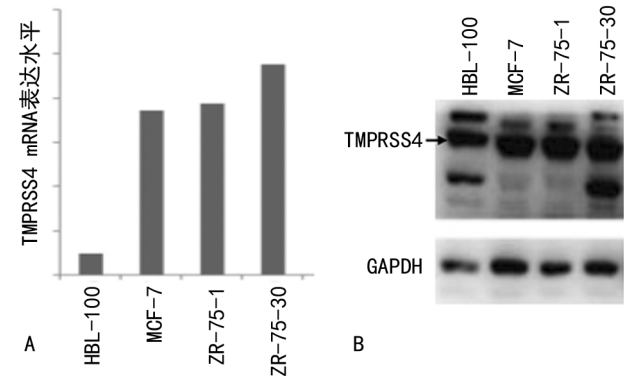
2 结 果

2.1 TMPRSS4 在乳腺癌细胞中的表达水平 TM-PRSS4 在正常乳腺细胞及 3 种乳腺癌细胞中 mRNA 和蛋白表达水平见图 1(GAPDH 为蛋白内参),与正常乳腺细胞比较,TMPRSS4 在 3 种乳腺癌细胞中均呈高表达。

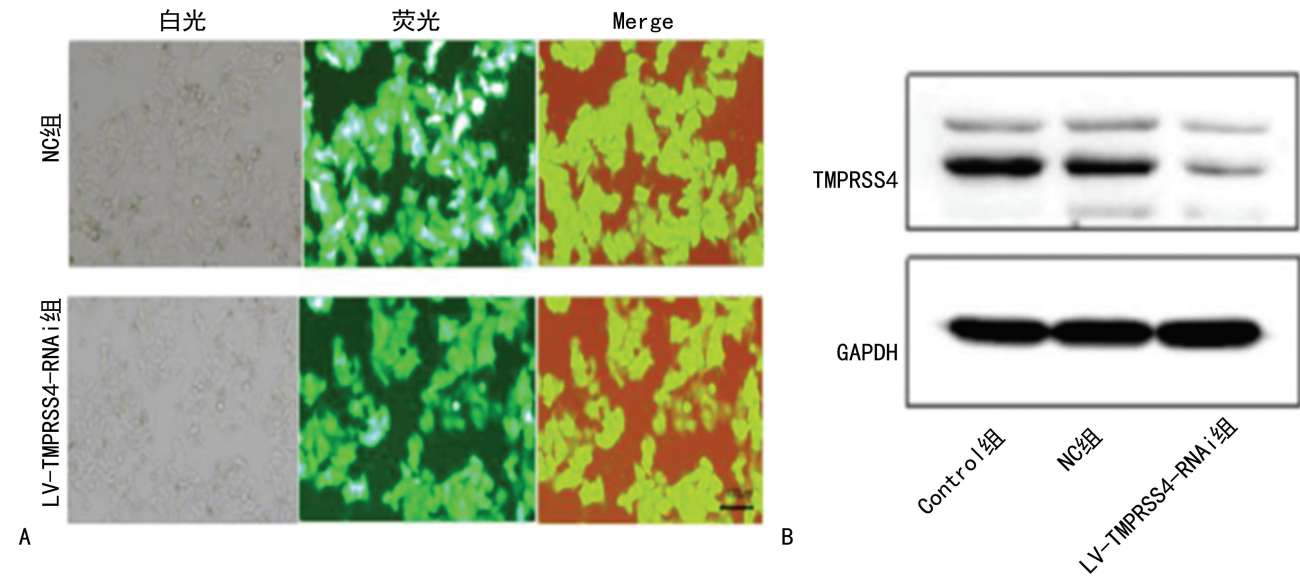
2.2 慢病毒转染效率和干涉效果 慢病毒转染后 TMPRSS4 在乳腺癌细胞 MCF-7 中表达水平比较见表 2。慢病毒转染 MCF-7 细胞 72 h 后,采用荧光显微镜观察转染效果,见图 2A。Western blot 检测转染后 TMPRSS4 蛋白表达水平见图 2B。

表 2 慢病毒转染后 TMPRSS4 在乳腺癌细胞 MCF-7 中表达水平比较(̄x±s)

组别	TMPRSS4 mRNA	TMPRSS4 蛋白
Control 组	0.556±0.034	0.957±0.121
NC 组	0.567±0.106	0.948±0.146
LV-TMPRSS4-RNAi 组	0.154±0.028	0.149±0.031
P	<0.05	<0.05



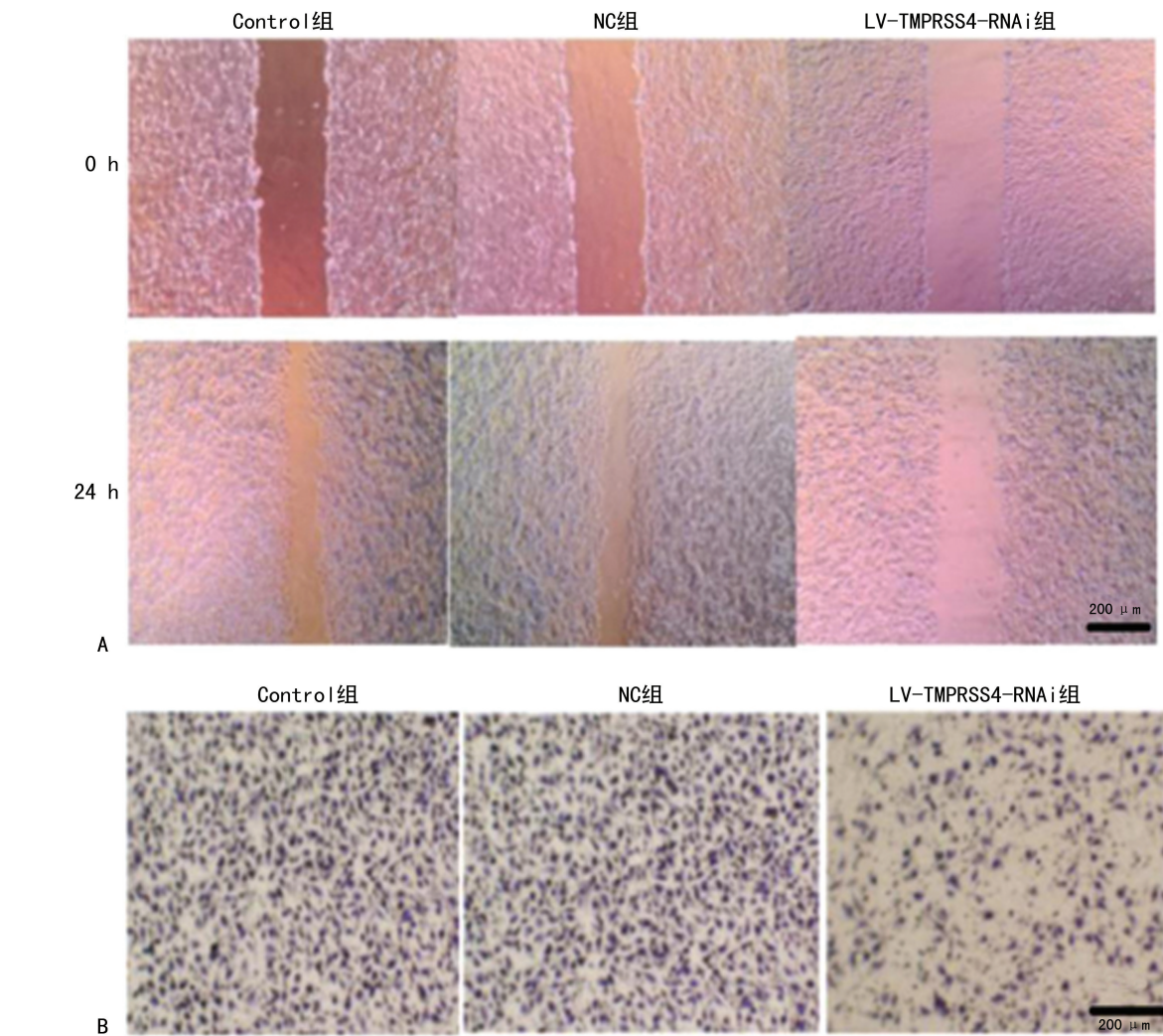
注:A 为 mRNA 表达水平;B 为蛋白表达水平。
图 1 TMPRSS4 在不同乳腺癌细胞中的表达水平



注:A 为慢病毒转染;B 为 TMPRSS4 蛋白表达水平。
图 2 慢病毒转染效果及 TMPRSS4 蛋白表达水平

2.3 TMPRSS4 沉默表达的 MCF-7 细胞转移和侵袭能力的变化 TMPRSS4 沉默表达的 MCF-7 细胞株

转移和侵袭能力均减弱,见图 3。



注:A 为转移实验;B 为侵袭实验。

图 3 MCF-7 细胞的转移和侵袭实验

3 讨 论

乳腺癌是女性常见的肿瘤。在美国,女性肿瘤患者中大约有 33% 是乳腺癌,在全球范围内,乳腺癌在肿瘤致死原因中居第 2 位^[8-9]。而在乳腺癌患者中,只有 10% 的死亡是由原发肿瘤引起,其余 90% 均是通过局部入侵淋巴、血管扩散转移到肝、肺、骨和大脑等器官导致患者死亡。有研究显示,乳腺癌可在早期就发生转移,其发生转移的机制是多种因素共同作用的结果^[10]。有研究表明,酪氨酸蛋白激酶可通过 TAZ 和 STAT5 信号调控骨-肿瘤相互作用来促进乳腺癌的溶骨性转移^[11];半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CST1)高表达可促进乳腺癌细胞增殖、增强其转移和侵袭能力,相反 CST1 沉默则会减弱这种恶性特征^[12];CHI 等^[13]研究发现,T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域蛋白高表达后也可以通过激活原癌基因 MYC 来促进乳腺癌细胞的转移和侵袭。有些因素会抑制乳腺癌的转移,有研究表明,miR-124-3p 可以通过抑制原癌基因 CBL 的表达负向调控乳腺癌细胞的转移和侵袭^[14];miR-199a-5p 在三阴性乳腺癌中可以

通过抑制 EMT 进程来抑制肿瘤的转移和侵袭^[15]。

TMPRSS4 是 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶家族中的一员,TMPRSS4 可在多种肿瘤中过表达,且参与肿瘤的侵袭和转移。有研究证明,TMPRSS4 在结肠癌中过表达,并且可促进 FAK、ERK1/2、Akt、Src 和 Rac1 活化,上调整合素-α5 调控肿瘤细胞的侵袭^[16]。在前列腺癌和肺癌细胞中,TMPRSS4 可诱导 uPA 基因表达,通过依赖 JNK 的方式激活转录因子 AP-1、Sp1/3 的活性调控癌细胞的侵袭和转移。另外,有研究显示,在肝癌细胞中,TMPRSS4 过表达可明显促进肝癌细胞的侵袭和转移来诱导肿瘤血管的生长。有研究表明,在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 TMPRSS4 可通过促进波形蛋白和 Slug,抑制 E-cadherin 和 claudin-1 的表达来促进乳腺癌细胞的转移和侵袭^[17]。本研究发现,TMPRSS4 在 MCF-7 细胞中呈高表达,并且在肿瘤的转移中起促进作用。本研究通过慢病毒转染 MCF-7 细胞干扰 TMPRSS4 的表达来研究其生物学功能,目前慢病毒转染被广泛应用于表达 RNAi 的研究中,慢病毒载体可以将外源性基因有效整合到

目标细胞染色体上,起干扰目标基因表达的作用,并且能够长期抑制目标基因在细胞中的表达。本研究发现,随着 TMPRSS4 表达水平的改变,MCF-7 细胞的转移和侵袭能力也发生变化。慢病毒转染 MCF-7 细胞后使 TMPRSS4 表达沉默,其转移和侵袭能力明显减弱。由此可以得出 TMPRSS4 可促进 MCF-7 细胞转移和侵袭的结论。

本研究推测,TMPRSS4 通过调控表皮生长因子受体(EGFR)基因表达来发挥作用。EGFR 是一种酪氨酸激酶受体蛋白,属于 ErbB 家族。EGFR 功能多样,有研究显示,EGFR 表达失控与肿瘤的转移密切相关^[17]。有研究发现,头颈部肿瘤、结直肠癌、乳腺癌、肺癌和膀胱肿瘤等均存在 EGFR 过表达^[18]。EGFR 还参与 EMT 进程的发生和癌细胞的转移,与癌细胞的增殖、运动、生存和转移有关。近期有研究表明,miRNAs 和其他蛋白可通过调控 EGFR 水平发挥生物学功能,在结直肠癌中,miR-520a-3p 可通过调控 EGFR 表达水平发挥肿瘤的抑制作用^[19]。在乳腺癌细胞中 POPDC1 可负调控 EGFR 诱导的细胞转移和增殖。在导管腺癌细胞中,claudin-18 通过 EGFR/RAS/ERK 通路过表达,对癌细胞的转移和侵袭发挥促进作用^[20]。由此,本研究推测,在乳腺癌 MCF-7 细胞中 TMPRSS4 也可能通过调控 EGFR 表达水平来调控肿瘤的转移、侵袭等生物学进程,这是下一步研究的重点。

综上所述,TMPRSS4 在乳腺癌 MCF-7 细胞中呈高表达,并且可增强细胞的转移和侵袭能力,加速肿瘤的进展。

参考文献

- [1] ASSANI G, YESSOUFOU A, XIONG Y D, et al. Role of TMPRSS4 modulation in breast cancer cell proliferation [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019, 20(6): 1849-1856.
- [2] BELLANGER M, ZEINOMAR N, TEHRANIFAR P, et al. Are global breast cancer incidence and mortality patterns related to country-specific economic development and prevention strategies? [J]. J Glob Oncol, 2018, 7(4): 1-16.
- [3] 张一宁, 陈吕奥, 吴亚敏, 等. GALNT6 通过 TGF- β /Smad 信号通路调控 EMT 促进乳腺癌转移[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(4): 759-769.
- [4] YE H, LI T D, WANG H, et al. TSPAN1, TMPRSS4, SDR16C5, and CTSE as novel panel for pancreatic cancer: a bioinformatics analysis and experiments validation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 649551.
- [5] 胡军, 罗毅, 谢勇, 等. RG108 调控 TFPI-2 甲基化/TMPRSS4 表达对 NSCLC 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(12): 1358-1364.
- [6] 王晓磊, 寇书诚, 周斌杰, 等. 跨膜丝氨酸蛋白酶 4 与 E-钙黏蛋白在 105 例结直肠癌中的表达及意义分析[J]. 肿瘤学杂志, 2020, 26(12): 1086-1089.
- [7] LI X M, LIU W L, CHEN X, et al. Overexpression of TMPRSS4 promotestumor proliferation and aggressiveness in breast cancer[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(4): 927-935.
- [8] LIN L Z, CAI M G, DAI Y C, et al. BRMS1 gene expression may be associated with clinico-pathological features of breast cancer [J]. Biosci Rep, 2017, 37(4): BSR20170672.
- [9] CHENG S J, CASTILLO V, WELTY M, et al. Breast defend enhances effect of tamoxifen in estrogen receptor-positive human breast cancer in vitro and in vivo[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 115-119.
- [10] XIE H Y, SHAO Z M, LI D Q. Tumor microenvironment; driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis[J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 36-39.
- [11] GU J Y, HUANG W J, ZHANG J F, et al. TMPRSS4 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma by activating ERK1/2 signaling pathway[J]. Front Oncol, 2021, 18(3): 628353.
- [12] DAI D N, LI Y, CHEN B, et al. Elevated expression of CST1 promotes breast cancer progression and predicts a poor prognosis[J]. J Mol Med, 2017, 95(8): 873-886.
- [13] CHI L M, ZOU Y J, QIN L, et al. TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC[J]. Breast Cancer Res, 2017, 19(1): 53-59.
- [14] WANG Y B, CHEN L X, WU Z Y, et al. miR-124-3p functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting CBL[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 826-829.
- [15] CHEN J W, SHIN V Y, SIU M T, et al. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 887-889.
- [16] 登峰, 杨宇慎, 王艺, 等. TMPRSS4 在裸鼠结肠癌肝转移模型的促癌机制研究[J]. 海南医学, 2020, 31(18): 2313-2317.
- [17] OLIVARES-CASTINEIRA I, LLIMARGAS M. EGFR controls drosophila tracheal tube elongation by intracellular trafficking regulation[J]. PLoS Genet, 2017, 13(7): e1006882.
- [18] ANVARI K, SIMA H R, SEILANIAN T M, et al. EGFR expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and its association with pathologic response to preoperative chemoradiotherapy: a study in northeastern iran[J]. Arch Iran Med, 2017, 20(4): 240-245.
- [19] ZHANG R, LIU R, LIU C, et al. A novel role for miR-520a-3p in regulating EGFR expression in colorectal cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1559-1574.
- [20] TAKASAWA K, TAKASAWA A, OSANAI M, et al. Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 403: 66-73.