

Heregulin- β 1 诱导的糖酵解对乳腺癌细胞 MCF7 迁移的影响*

蒋素芳¹, 屠凯岭¹, 周 兰², 傅 强¹, 赵玉华^{1 Δ}

1. 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(成都 610041);

2. 四川大学华西基础医学与法医学院 人体解剖学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨 heregulin- β 1(HRG- β 1)对糖酵解的诱导作用及其诱导的糖酵解在乳腺癌细胞 MCF7 迁移中的作用。方法 用 PBS(对照组)或 HRG- β 1 处理 MCF7 细胞 12、24 和 48 h,或 HRG- β 1+草氨酸盐(oxamate, OX)联用处理 MCF7 细胞 24 h,收集培养基测定葡萄糖消耗量和乳酸生成量,收集细胞用 Western blot 检测乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)蛋白的表达。用 PBS(对照组)、HRG- β 1 或 HRG- β 1+OX 联用处理 MCF7 细胞 48 h,划痕实验检测伤口愈合率以反映细胞的迁移能力。结果 HRG- β 1 处理 MCF7 细胞 12、24 和 48 h 组的葡萄糖消耗量、乳酸生成量和 LDHA 蛋白水平增加均在 24 h 达最大值,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与 HRG- β 1 诱导组比较,HRG- β 1+OX 联用组的葡萄糖消耗量差异无统计学意义($P>0.05$),乳酸生成量降低($P<0.01$),LDHA 蛋白表达量减少($P<0.05$);MCF7 细胞划痕 48 h 后,对照组和 HRG- β 1+OX 联用组的伤口愈合率相当($P>0.05$),均低于 HRG- β 1 诱导组,差异有统计学意义($P<0.001$)。结论 HRG- β 1 通过上调 LDHA 诱导糖酵解从而促进乳腺癌细胞 MCF7 的迁移。

【关键词】 Heregulin- β 1 乳酸脱氢酶 A 糖酵解 细胞迁移

Heregulin- β 1-induced Glycolysis Promotes Migration of Breast Cancer Cell Line MCF7 JIANG Su-fang¹, TU Kai-ling¹, ZHOU Lan², FU Qiang¹, ZHAO Yu-hua^{1 Δ} . 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 60041, China; 2. Department of Anatomy, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 60041, China

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

【Abstract】 Objective To explore whether heregulin- β 1 (HRG- β 1) can induce glycolysis and the role of HRG- β 1-induced glycolysis in the migration of human breast cancer cell line MCF7. **Methods** MCF7 cells were treated with PBS (PBS group) or HRG- β 1 for 12, 24 and 48 h. Culture media were harvested for glucose uptake and lactate production assays, and cells were collected and lactate dehydrogenase A (LDHA) protein levels were detected by using Western blot. MCF7 cells were treated with PBS (PBS group), HRG- β 1 or HRG- β 1 plus oxamate (OX) for 24 h. Culture media were harvested for glucose uptake and lactate production assays, and cells were harvested and the protein levels of LDHA was detected by Western blot. The wound healing assay was used to detect the migration of MCF7 cells treated with PBS (PBS group), HRG- β 1 or HRG- β 1 plus OX for 48 h. **Results** MCF7 cells treated with HRG- β 1 for 12, 24 and 48 h displayed higher levels of glucose uptake, lactate production and LDHA protein levels when the levels reached the peak at 24 h. The differences of glucose uptake, lactate production and LDHA protein levels between PBS group and HRG- β 1 group were statistically significant ($P<0.05$). Compared to HRG- β 1 group, the glucose uptake of HRG- β 1 plus OX treated group was not significantly different ($P>0.05$), but the statistically significant decrease of lactate production and LDHA protein levels were noticed ($P<0.01$ and $P<0.05$). When MCF7 cells were scratched for 48 h, the wound healing rate of control group, HRG- β 1 group and HRG- β 1 plus OX group was (49 \pm 5.09)%, (100 \pm 2.21)% and (51 \pm 4.10)% respectively. The difference of each group was statistically significant ($P<0.001$). **Conclusion** HRG- β 1 induces glycolysis via upregulation of LDHA and HRG- β 1-induced glycolysis promotes the migration of breast cancer cells line MCF7.

【Key words】 Heregulin- β 1 Lactate dehydrogenase A Glycolysis Migration

肿瘤细胞的代谢特征不同于正常细胞。正常细胞在有氧条件下,主要依赖于线粒体氧化磷酸化消耗氧气和葡萄糖产生 ATP,而糖酵解却受到抑制。

* 国家自然科学基金(No. 81272907)资助

Δ 通信作者, E-mail: zhaoyh@scu.edu.cn

而在许多恶性肿瘤细胞中,即使在氧气充足的情况下,糖酵解也十分活跃,这种现象被称为 Warburg 效应^[1-3]。Warburg 效应是恶性肿瘤细胞的一个显著特征,而且在肿瘤的发生发展中起重要作用^[2]。

糖酵解的最终产物是乳酸,大量的研究结果证实乳酸在肿瘤的恶性发展(包括细胞的迁移、侵袭和转移)中起重要作用^[4-5]。但现有研究均是通过加入外源性乳酸来进行,糖酵解增强直接导致的内源性乳酸增加在肿瘤细胞迁移、侵袭和转移中的作用尚未见报道。Heregulin- β 1 (HRG- β 1), 也称为 neuregulin- β 1, 是 EGF 家族的一个成员^[6], 能与 HER3 或 HER4 结合, 促进 HER3 或 HER4 与 HER2 形成异源二聚体激活 HER2 通路^[7], 促进乳腺癌细胞上皮间质细胞转化 (EMT)、迁移、侵袭和转移^[8-10]。乳酸脱氢酶 A (LDHA) 是糖酵解途径中的关键酶之一, 催化丙酮酸转变成乳酸。我们的前期研究结果证实, HER2/LDHA 是乳腺癌细胞中调节糖酵解的一条重要通路^[11]。HRG- β 1 能活化乳腺癌细胞中的 HER2 信号通路, 但 HRG- β 1 能否诱导糖酵解及其诱导的糖酵解在乳腺癌细胞迁移中的作用尚未见报道。本研究将探讨 HRG- β 1 对糖酵解的诱导作用及 HRG- β 1 诱导的糖酵解在乳腺癌 MCF7 细胞迁移中的作用和分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及试剂盒

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。LDHA 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, 胎牛血清 (FBS)、双抗、DMEM/F12 培养基和胰蛋白酶购自 Hyclone 公司, 化学发光试剂盒购自 Thermo 公司。重组人 Heregulin- β 1 购自 Peprotech 公司, β -actin 抗体和草氨酸盐 (oxamate, OX) 购自 Sigma 公司, 乳酸测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 葡萄糖测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF7 细胞采用含 100 mL/L FBS 和 10 mL/L 双抗的 DMEM/F12 培养基, 于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 葡萄糖消耗量和乳酸生成量的测定 将 MCF7 细胞接种于 12 孔板 (每孔 3×10^5), 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养 24 h 后, 换为含 5 mL/L FBS 的培养基, 饥饿培养 12 h 后换为 DMEM 低糖

培养基。实验分两部分: 第一部分, 单独加入 PBS (对照组) 或 HRG- β 1 (100 ng/mL, 作用 12 h、24 h、48 h), 以选择 HRG- β 1 的最佳作用时点; 第二部分, ①单独加入 PBS (对照组), 作用 24 h; ②单独加入 HRG- β 1 (100 ng/mL), 作用 24 h; ③同时加入 HRG- β 1 (100 ng/mL) 和 OX (50 mmol/L), 作用 24 h。处理结束后, 收集培养基分别用葡萄糖试剂盒和乳酸试剂盒检测葡萄糖浓度和乳酸浓度, 根据葡萄糖浓度 (或乳酸浓度) 计算葡萄糖消耗量 (或乳酸生成量)。以单独加入 PBS 的对照组葡萄糖消耗量 (或乳酸生成量) 为 100%, 计算实验组葡萄糖消耗量 (或乳酸生成量) 的百分率。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 LDHA 蛋白表达 实验分组同 1.2.2。处理结束后, 提取各组蛋白, 100 °C 变性 5 min, 每孔上样量 40 μ g。100 mL/L SDS-PAGE 电泳后, 半干转电泳仪电转 0.2 μ m PVDF 膜, 电压 10 V, 60 min。50 mL/L 脱脂牛奶封闭液室温封闭 1 h, 1 \times TBST 洗膜。孵育 LDHA 抗体 (工作浓度 1:1 000), 4 °C, 过夜。1 \times TBST 洗膜, 与辣根酶过氧化物酶标记的二抗 (工作浓度 1:3 000) 室温孵育 1 h, 以 β -actin 为内参, 化学发光试剂盒检测目的条带。使用 Image Lab 软件拍照并进行灰度扫描, 以目的条带与内参条带灰度比值作为 LDHA 蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.4 细胞划痕实验 用划痕实验检测 MCF7 细胞的迁移能力。MCF7 细胞用胰蛋白酶消化后, 以 2.4×10^6 /孔接种于 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 过夜培养, 然后换为含 5 mL/L FBS 的培养基, 饥饿培养 12 h 后, 用 10 μ L 移液枪头划痕, PBS 洗去漂浮的细胞后分为 3 组: ①单独加入 PBS 液; ②单独加入 HRG- β 1 (100 ng/mL); ③同时加入 HRG- β 1 和 OX (50 mmol/L)。分别在划痕后 0 h 和 48 h 于 40 倍镜下选择 4 个视野拍照, 测量所选视野内伤口宽度。迁移能力用伤口愈合率表示, 即 48 h 伤口宽度与 0 h 伤口宽度的比率。实验重复 3 次。伤口愈合率越高, 细胞迁移能力越强。

1.2.5 统计学方法 用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HRG- β 1 对 MCF7 细胞糖酵解的诱导作用

结果见图 1。用 HRG- β 1 处理 MCF7 细胞 12 h 后, 葡萄糖消耗量和乳酸生成量均显著增加, 与 PBS

组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);且在 24 h 达最大值,48 h 恢复至 12 h 水平,12 h、48 h 的葡萄糖消耗量和乳酸生成量与 24 h 比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。乳酸生成量的变化趋势与葡萄糖消耗量一致。

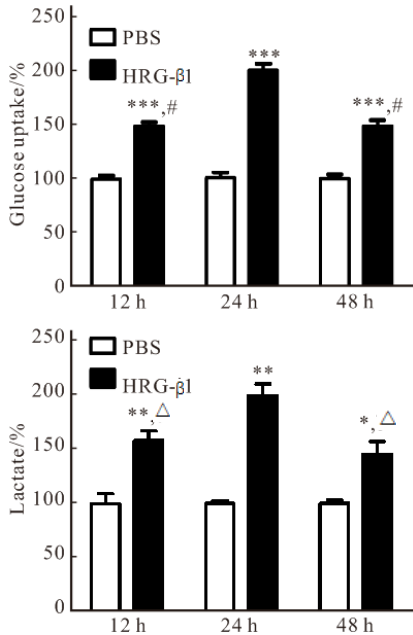


图 1 HRG-β1 诱导 MCF7 细胞的糖酵解

Fig 1 HRG-β1 induces glycolysis in MCF7 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. PBS group; Δ $P < 0.05$, # $P < 0.01$, vs. HRG-β1 group at 24 h

2.2 HRG-β1 对 LDHA 蛋白表达的影响

如图 2 所示,用 HRG-β1 处理 MCF7 细胞 12 h 后,LDHA 蛋白表达增加,且在 24 h 达最高值,48 h 恢复至 12 h 水平。设对照组 LDHA 蛋白的相对表达量为 100%,12 h 时 LDHA 蛋白相对表达量为 (150 ± 2.64)%,24 h 时相对表达量为 (230 ± 3.72)%,48 h 时相对表达量为 (130 ± 5.56)%,24 h 时 LDHA 蛋白的表达量约为 12 h 的 1.5 倍 ($P < 0.05$),约为 48 h 的 1.7 倍 ($P < 0.05$)。说明

附表 OX 对 HRG-β1 诱导糖酵解、LDHA 表达、细胞迁移的逆转作用/%

Table HRG-β1-induced glycolysis, LDHA expression and cell migration reversed by being treated with OX/%

Item	n	PBS group	HRG-β1 group	HRG-β1+OX group
Glucose uptake (24 h)	3	100*	202.00 ± 18.29	184.00 ± 2.10
Lactate production (24 h)	3	100*	180.00 ± 15.42	106.00 ± 7.03*
LDHA protein (24 h)	3	100*	210.00 ± 9.75	98.00 ± 5.31*
Wound closure ratio (48 h/0 h)	3	49.00 ± 5.09**	100.00 ± 2.21	51.00 ± 4.10**

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, vs. HRG-β1 group

HRG-β1 诱导组细胞伤口愈合率大于对照组 ($P < 0.001$),证明 HRG-β1 能诱导乳腺癌细胞的迁移;HRG-β1+OX 联用组伤口愈合率较 HRG-β1 诱导

HRG-β1 能上调 LDHA 的蛋白表达并且与糖酵解的上调趋势一致。因 HRG-β1 诱导糖酵解和 LDHA 蛋白的表达在 24 h 均达到最大值,故后续葡萄糖、乳酸和 LDHA 蛋白表达的实验选择 HRG-β1 处理 MCF7 细胞的时间为 24 h。

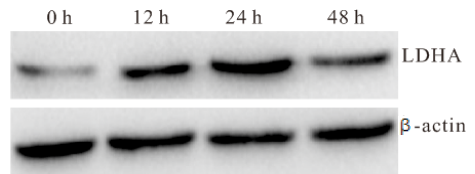


图 2 HRG-β1 对 LDHA 蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of HRG-β1 on LDHA protein levels

2.3 OX 对 HRG-β1 诱导糖酵解和 LDHA 蛋白表达的逆转作用

结果见图 3、附表。用 HRG-β1 + OX 处理 MCF7 细胞 24 h 后,OX 抑制了 HRG-β1 诱导的乳酸生成 ($P < 0.05$),但对葡萄糖消耗量的影响不大 ($P > 0.05$)。Western blot 结果显示(设对照组 LDHA 蛋白相对表达量为 100%),OX 对 HRG-β1 诱导的 LDHA 蛋白表达也有逆转作用,HRG-β1 + OX 联用组 LDHA 蛋白表达量约为 HRG-β1 诱导组的 50% ($P < 0.05$)。

2.4 OX 对 HRG-β1 诱导 MCF7 细胞迁移的逆转作用

如附表、图 4 所示, MCF7 细胞划痕 48 h 后,

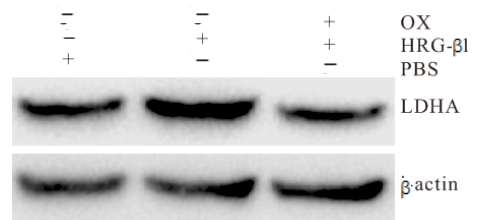


图 3 OX 对 HRG-β1 上调 LDHA 蛋白的影响

Fig 3 Effect of OX on HRG-β1-upregulated LDHA protein

组降低 ($P < 0.001$),与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明 OX 能逆转 HRG-β1 对 MCF7 细胞迁移的诱导作用。

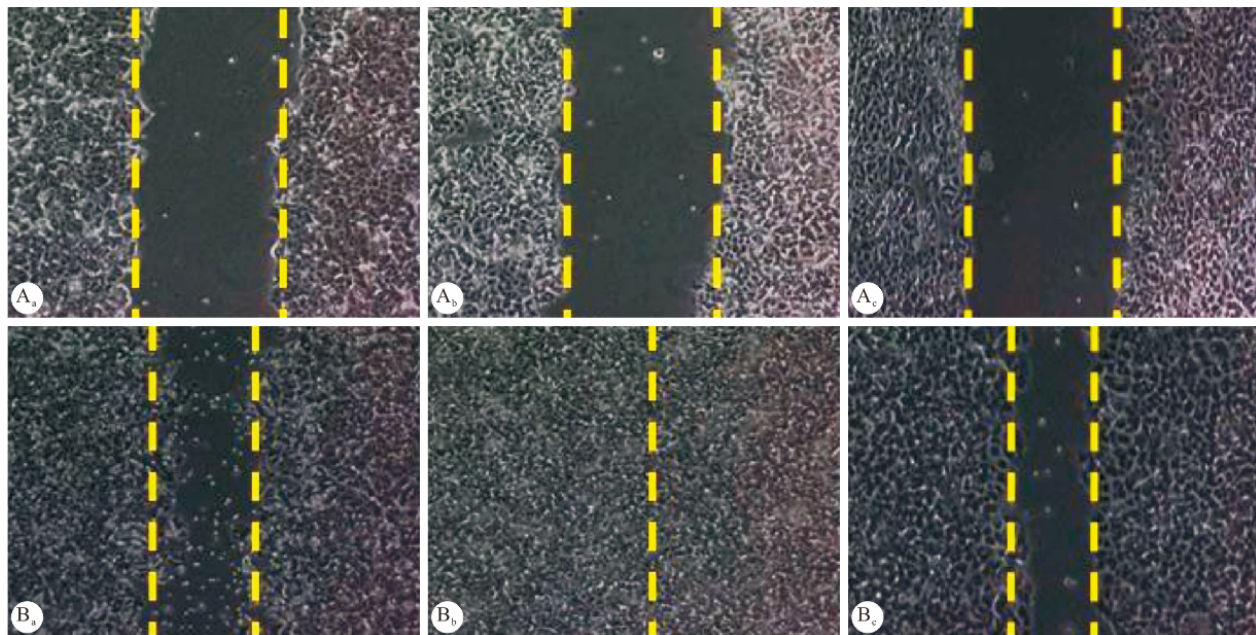


图 4 OX 逆转 HRG- β 1 诱导的细胞迁移

Fig 4 OX reverses HRG- β 1-induced cell migration

A: 0 h; B: 48 h; a: PBS group; b: HRG- β 1 group; c: HRG- β 1+OX group

3 讨论

Warburg 效应是恶性肿瘤细胞的一个显著特征而且在肿瘤的发生发展中起重要作用^[2]。乳酸是糖酵解最终产物,对肿瘤恶性发展有重要作用。但现有实验研究均通过加入外源性乳酸进行。糖酵解增强直接导致的内源性乳酸增加在肿瘤细胞迁移、侵袭和转移中的作用尚未见报道。

到目前为止,在乳腺癌细胞系中,国内外尚未见 HRG- β 1 与糖酵解之间关系的报道。本研究使用 HER2 低表达、HER3 高表达的 MCF7 细胞系来研究 HRG- β 1 与糖酵解的关系,结果显示,HRG- β 1 能显著增加 MCF7 细胞的葡萄糖消耗量和乳酸生成量,证明 HRG- β 1 能诱导糖酵解。同时本研究还发现 HRG- β 1 可促进 LDHA 蛋白的表达。OX 是 LDHA 的抑制剂,能抑制糖酵解^[11]。用 HRG- β 1+OX 处理 MCF7 细胞后,OX 显著抑制了 HRG- β 1 诱导的乳酸生成,说明 OX 可以逆转 HRG- β 1 诱导的糖酵解。OX 同时抑制了 LDHA 的蛋白表达,进一步证明 HRG- β 1 诱导糖酵解的机制为上调 LDHA 蛋白的表达。我们的前期研究证明,HER2 的过表达通过上调 LDHA 而促进糖酵解^[12],HRG- β 1 能活化乳腺癌细胞中的 HER2 信号通路^[13],说明 HER2 过表达或 HRG- β 1 引起的 HER2 通路活化均能通过上调 LDHA 而促进乳腺癌细胞的糖酵

解。

本研究还证实 HRG- β 1 能通过糖酵解诱导乳腺癌细胞的迁移。CHENG 等^[14]的研究证明,在乳腺癌细胞中,HRG- β 1 可通过 PI3K/AKT 信号通路上调 Snail 而诱导 EMT。RUAN 等^[15-16]证明,HRG- β 1 通过 MAPK/ERK 信号通路上调 GPR30 诱导乳腺癌细胞迁移和侵袭。由此可见,HRG- β 1 诱导乳腺癌细胞迁移和侵袭主要通过 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路。AKT 能促进肿瘤细胞的糖酵解^[17],因此我们推测在 MCF7 细胞中,HRG- β 1 通过激活 HER2 信号通路而活化 PI3K/AKT 途径,进而诱导糖酵解,最终促进细胞的迁移,该假设还有待于进一步的实验证实。本研究显示,HRG- β 1 能够诱导细胞迁移,但糖酵解抑制剂 OX 却可以降低 HRG- β 1 的诱导作用,证明 HRG- β 1 促进细胞迁移依赖于糖酵解。HRG- β 1 通过上调 LDHA 诱导糖酵解,进一步促进细胞迁移在我们的研究中得到证实,但这一分子机制是否与 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路有关还有待于进一步研究。

综上所述,在乳腺癌细胞 MCF7 中,HRG- β 1 可通过上调 LDHA 蛋白的表达而诱导糖酵解,进而促进细胞的迁移,为糖酵解和乳腺癌细胞迁移的直接关系提供了有力证据,为进一步研究糖酵解在乳腺癌细胞侵袭转移中的作用奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] DEBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G, *et al.* The biology of cancer; metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 2008, 7(1):11-20.
- [2] GILLIES RJ, ROBEY I, GATENBY RA. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med*, 2008, 49 Suppl 2:24S-42S.
- [3] HSU PP, SABATINI DM. Cancer cell metabolism; Warburg and beyond. *Cell*, 2008, 134(5):703-707.
- [4] GOETZE K, WALENTA S, KSIAZKIEWICZ M, *et al.* Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol*, 2011, 39(2):453-463.
- [5] HIRSCHHAEUSER F, SATTLER UG, MUELLER-KLIESER W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, 2011, 71(22):6921-6925.
- [6] MONTERO JC, RODRIGUEZ-BARRUECO R, OCANA A, *et al.* Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(11):3237-3241.
- [7] GARRATT AN. "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(2):215-218.
- [8] HERNANDEZ L, SMIRNOVA T, KEDRIN D, *et al.* The EGF/CSF-1 paracrine invasion loop can be triggered by heregulin beta1 and CXCL12. *Cancer Res*, 2009, 69(7):3221-3227.
- [9] KUSHIMA Y, IIDA K, NAGAOKA Y, *et al.* Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate against heregulin beta1-induced migration/invasion of the MCF-7 breast carcinoma cell line. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5):899-904.
- [10] KIM J, JEONG H, LEE Y, *et al.* HRG-beta1-driven ErbB3 signaling induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2013(13):383. doi:10.1186/1471-2407-13-383.
- [11] ZHOU M, ZHAO Y, DING Y, *et al.* Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer*, 2010(9):33. doi:10.1186/1476-4598-9-33.
- [12] ZHAO YH, ZHOU M, LIU H, *et al.* Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene*, 2009, 28(42):3689-3701.
- [13] YUSTE L, MONTERO JC, ESPARIS-OGANDO A, *et al.* Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to hereceptin. *Cancer Res*, 2005, 65(15):6801-6810.
- [14] CHENG L, 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. *Cancer Lett*, 2009, 280(1):50-60.
- [15] RUAN SQ, WANG SW, WANG ZH, *et al.* Regulation of HRG-beta1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1):131-138.
- [16] RUAN SQ, WANG ZH, WANG SW, *et al.* Heregulin-beta1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2):385-390.
- [17] ELSTROM RL, BAUER DE, BUZZAI M, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3892-3899.
- (2015-09-12 收稿, 2015-12-11 修回)
- 编辑 余琳
-
- (上接第 462 页)
- [11] YOSHINAGA A, KAJIYA N, OISHI K, *et al.* NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation. *Eur J Pharmacol*, 2016(782):21-29.
- [12] LI Y, HUANG X, WANG C, *et al.* Ganglioside GM3 exerts opposite effects on motility via epidermal growth factor receptor and hepatocyte growth factor receptor-mediated migration signaling. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4):2959-2966.
- [13] SCARINGI R, PICCOLI M, PAPINI N, *et al.* NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *J Biol Chem*, 2013, 288(5):3153-3162.
- [14] Li J, MCCLANE BA. The Sialidases of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 differ in their properties and sensitivities to inhibitors. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(5):1701-1709.
- (2015-10-28 收稿, 2016-03-07 修回)
- 编辑 汤洁