



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200008

## MRTF-A 参与一氧化氮诱导的乳腺癌迁移相关基因表达

卢玉琳, 胡娟, 李智, 何红鹏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为研究 NO 对乳腺癌细胞迁移能力的影响及其分子机制,本研究首先用梯度浓度 NO 供体 SNP 处理乳腺癌细胞 MCF-7, MTT 法检测细胞活性,发现高浓度 SNP 抑制细胞增殖;PI-Annexin V 和 Hoechst 细胞核染色检测结果显示,高浓度 NO 促进细胞凋亡.用低浓度 SNP 处理细胞,划痕愈合及小室迁移实验结果显示,低浓度 SNP 促进细胞迁移;RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,低浓度 SNP 上调转录调控辅因子 MRTF-A 及其下游的迁移相关基因 MYL9、MYH9 和 CYR61 的表达.在 MCF-7 细胞敲低 NOS2 基因同样导致 MRTF-A、MYL9、MYH9 及 CYR61 表达下降;敲低 MRTF-A 则 SNP 不再促进上述迁移相关基因的表达.以上实验结果提示:NO 的肿瘤生物学效应与 NO 浓度密切相关,细胞内源性或外源性低浓度 NO 可能通过刺激迁移相关基因表达而促进乳腺癌细胞转移,而 MRTF-A 参与了 NO 诱导的迁移相关基因表达.

**关键词:** 一氧化氮; 乳腺癌; MRTF-A; 细胞迁移

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)05-0008-07

## MRTF-A Involved Expression of Nitric Oxide Induced Migration-related Gene in Breast Cancer Cells

LU Yulin, HU Juan, LI Zhi, HE Hongpeng

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To study the effect of NO on the migration ability of breast cancer cells and its molecular mechanism, breast cancer cells MCF-7 were treated with serial diluted NO donor SNP. The results of MTT assay showed that, at higher concentrations, SNP inhibited the proliferation of MCF-7 cells and induced apoptosis as demonstrated by PI-Annexin and Hoechst nuclear staining assays. Wound-healing and Transwell chamber migration assays revealed that the low concentrations of NO promoted the migration of MCF-7 cells. The results of RT-qPCR and Western blot showed that, at low concentrations, NO stimulated the expression of a transcription co-activator MRTF-A and its downstream migration-related genes MYL9, MYH9 and CYR61. In MCF-7 cells, the expression of MRTF-A, MYL9, MYH9 and CYR61 also decreased following the knock-down of NO synthetase gene NOS2. Knockdown of MRTF-A in MCF-7 cells reversed the inducing effect of SNP on the expression of migration-related genes. These results suggest that the biological effects of NO are concentration-dependent. At low concentrations, both endogenous and exogenous NO promoted the migration of breast cancer cells by stimulating the expression of migration-related genes which were regulated by MRTF-A.

**Key words:** nitric oxide; breast cancer; MRTF-A; cell migration

乳腺癌作为女性重大恶性肿瘤,其发病率有逐年升高趋势,且发病年龄呈年轻化倾向<sup>[1]</sup>.乳腺癌对生命的主要威胁来自肿瘤细胞的转移,包括肺转移、脑

转移等.肿瘤转移是一个复杂的、多步骤过程.细胞迁移能力的增强是肿瘤转移的必要条件之一<sup>[2]</sup>.

一氧化氮(NO)是重要的生物活性气体分子,在

收稿日期: 2020-01-12; 修回日期: 2020-03-11

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC91500)

作者简介: 卢玉琳(1994—),女,山东威海人,硕士研究生;通信作者: 何红鹏,副教授, hehongpeng@tust.edu.cn

细胞内主要以 L-精氨酸为底物,由一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)催化合成<sup>[3]</sup>。正常情况下, NOS 仅在血管内皮细胞和神经细胞中表达,分别被称为神经型 nNOS/NOS1 和上皮型 eNOS/NOS3。在炎症发生时,巨噬细胞也能表达 NOS;另外,恶性肿瘤细胞也能高水平表达 NOS,在巨噬细胞和恶性肿瘤细胞表达的是诱导型 NOS,即 iNOS/NOS2。iNOS/NOS2 在炎症和恶性肿瘤中通过催化 NO 合成发挥促炎和促癌作用<sup>[4-5]</sup>。

在体内, NO 主要通过两种方式发挥其作用:一是通过经典的 NO-cGMP 信号途径;二是通过对蛋白质进行翻译后修饰作用,即蛋白质的硝基化和亚硝基化修饰,继而影响蛋白质活性、细胞内定位以及蛋白质相互作用<sup>[6-7]</sup>。在恶性肿瘤发病中, NO 可以诱导肿瘤血管生成,影响肿瘤细胞增殖、凋亡和转移<sup>[6-8]</sup>,但是到目前为止, NO 影响乳腺癌转移的分子机制仍不确定。

MRTF-A(myocardin-related transcription factor-A)是血清反应因子(serum response factor, SRF)的转录辅助因子。大量研究证明, MRTF-A 能够调节细胞迁移相关基因 MYL9(myosin regulatory light chain 9)、MYH9(non-muscle myosin heavy chain 9)和 CYR61(cysteine-rich angiogenic inducer 61)等基因的表达,增强细胞的迁移能力,在肿瘤转移中发挥重要作用<sup>[9-11]</sup>。虽然 NO 与 MRTF-A 均促进乳腺癌转移,但是二者之间的关系未见文献报道。

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)是一种硝酸酯类的扩血管药物,常用于高血压的治疗。在体内, SNP 转化为 NO 气体分子并与血管平滑肌受体结合,使血管平滑肌松弛;在实验室中, SNP 是一种常用的 NO 供体,常用于 NO 功能研究。

在乳腺癌患者中, 70%~80% 为雌激素受体阳性,故本研究以 SNP 作为 NO 供体处理雌激素受体阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞,探究 NO 对癌细胞迁移的影响,并在分子水平研究 NO 促进 MCF-7 细胞迁移的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院细胞库。胎牛血清,天津康源生物技术有限公司;细胞完全培养基 F12, HyClone 公司; SNP、Hemoglobin(NO 清除

剂)、Hoechst、一氧化氮检测试剂盒(S0021),上海碧云天生物技术有限公司; TurboFect™ 体外转染试剂, Thermo Fisher 公司; Trizol 试剂、M-MLV 逆转录试剂盒,美国 Invitrogen 公司; SYBR GREEN 染料,德国 DBI 公司;青霉素、链霉素等,北京索莱宝科技有限公司。iNOS/NOS2 的小干扰 RNA 由广州锐博公司设计并合成(siNOS2 1<sup>#</sup> GUGCGUUACUCCACCAAC AdTdT; siNOS2 2<sup>#</sup> CGUGCAAACCUUCAAGGCAdT dT; siNOS2 3<sup>#</sup> CCAGAAGCGCUAUCACGAAdTdT)。MRTF-A 敲低质粒 shMRTF-A 由本实验室构建<sup>[12]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与转染

F12 培养基添加 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素,细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

转染前 1 d 用 6 孔板进行细胞接种, 2 d 时细胞密度约为 70%。用 TurboFect 转染试剂按说明书步骤转染 siRNA 或 shRNA,使 siRNA 的终浓度为 100 nmol/L, shRNA 质粒用量为每孔 4 μg。将 6 孔板转移至 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 6 h,更换培养基为含有 10% 胎牛血清的完全培养基继续培养 48 h。

#### 1.2.2 Griess 法检测 NO 浓度

采用 NO 检测试剂盒,按照说明书推荐步骤操作。首先,用细胞培养液稀释试剂盒提供的标准品 NaNO<sub>2</sub>,使对应 NO 浓度范围为 1~100 μmol/L。然后,按每孔 50 μL,在 96 孔板中分别加入标准品及样品。再依次加入等体积的 Griess 试剂 I 和 II,在常温下反应 10 min。将反应后的产物转移到酶标板内,在酶标仪上检测 540 nm 处的吸光度。根据标准曲线计算细胞培养基的 NO 浓度。

#### 1.2.3 MTT 法检测细胞活性

对数生长期细胞悬浮并计数,取 100 μL 接种于 96 孔板,使细胞密度为 2000 个/孔。于 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育至细胞密度为 70%,加入不同浓度 SNP,继续培养 24 h。每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续孵育 4 h。吸去培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),避光低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪测定 490 nm 处各孔的吸光度,计算细胞活性。

#### 1.2.4 Hoechst 法和流式细胞术检测细胞凋亡

MCF-7 细胞加药处理 24 h 后,用 PBS 洗 3 次;每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛,室温放置 15 min, PBS 洗 3 次;加适当比例稀释的 Hoechst, 37℃ 避光孵育

1 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 在共聚焦显微镜下观察细胞核形态并拍照记录结果。

贴壁生长的细胞经胰酶消化后, 用 PBS 漂洗吹悬。按 PI-Annexin V 凋亡检测试剂盒步骤, 加入 1 × binding buffer, 800 r/min 离心 10 min; 加入 500 μL binding buffer 吹悬细胞, 使细胞浓度为  $10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ; 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 ~ 10 μL PI 染色, 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min; 根据设定好的程序使用 C6 型流式细胞仪 (BD 公司) 进行检测, 并用 CFlow Plus 软件分析结果。

### 1.2.5 细胞划痕愈合实验

将细胞按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 24 h 后在每孔中央用 10 μL 吸头形成划痕。用 PBS 充分洗去漂浮细胞。向各孔细胞中加入含不同浓度的 SNP 的无血清培养基培养。划痕完成后每隔 12 h 在显微镜下观察划痕宽度变化情况, 拍照并计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = \frac{0 \text{ h 划痕宽度} - 36 \text{ h 划痕宽度}}{0 \text{ h 划痕宽度}} \quad (1)$$

### 1.2.6 Transwell 细胞迁移实验

将状态良好的 MCF-7 细胞按照每孔约  $5 \times 10^5$  个细胞铺在 24 孔 Transwell 上层小室; 下室加含 10% FBS 的培养液, 培养 24 h 后, 用棉签将上室中未迁移的细胞擦掉, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, DAPI 染色, 通过激光扫描共聚焦显微镜拍照并计数上、下、左、右、中 5 个视野下的细胞数, 计算相对细胞迁移率。

$$\text{相对细胞迁移率} = \frac{\text{SNP 组穿过滤膜细胞数}}{\text{对照组穿过滤膜细胞数}} \quad (2)$$

### 1.2.7 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

4 °C 条件下用 Trizol 裂解细胞, 提取总 RNA, 进行逆转录得到 cDNA, 随后进行 Real-time PCR。引物序列为 GAPDH 上游 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', 下游 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3'; MYL9 上游 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3', 下游 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3'; NOS2 上游 5'-AGCGGTAACAAAGGAGATAGA-3', 下游 5'-CTTGGTGGCGAAGATGAG-3'; MRTF-A 上游 5'-ACCGTGACCAATAAGAATGC-3', 下游 5'-CCGCTCTGATGAGAATGTC-3'; MYH9 上游 5'-AGCGTTACTACTCAGGGCTCATC-3', 下游 5'-TCATACTCCTGTAGGCGGTGTCT-3'; CYR61 上游 5'-AGGATAGTATCAAGGACCCC-3', 下游 5'-TCCATTCCAAAAACA

GGGAG-3'。Real-time PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 40 个循环, 每个循环 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 95 °C 延伸 1 min, 95 °C 终止反应 10 s, 以  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法对结果进行计算, GAPDH 为内参。

### 1.2.8 免疫印迹 (Western blot) 检测蛋白表达水平

收集处理组及对照组的细胞, 加入 SDS 裂解液, 提取细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 通过半干电转移法将蛋白转移至硝酸纤维素膜。用封闭液室温封闭 1 h, 分别用 MYH9 抗体 (Santa Cruz)、MYL9 抗体 (Santa Cruz)、CYR61 抗体 (Santa Cruz)、MRTF-A 抗体 (Proteintech)、GAPDH 抗体 (Santa Cruz) 孵育, 4 °C 过夜, 洗膜后加入相对应的二抗 (山羊抗兔荧光二抗、山羊抗鼠荧光二抗) 室温避光孵育 1.5 ~ 2 h, 洗膜 3 次, 用 Odyssey 成像系统扫膜记录结果。

## 1.3 统计学分析

实验数据使用 SPSS v13.0 软件处理; 各组实验数据以“均值 ± 标准差”表示。组间统计学差异分析采用 *t* 检验, \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 NO 对 MCF-7 细胞增殖的影响

为了确定 SNP 作为细胞外 NO 供体的有效性, 利用 Griess 法检测加 SNP 24 h 后培养基中 NO 含量, 结果如图 1 所示。与未加药组相比, 不同浓度 SNP 均可以释放 NO, 且 NO 含量随着加入 SNP 浓度升高而增加, 确定了 SNP 作为 NO 供体药物的有效性。

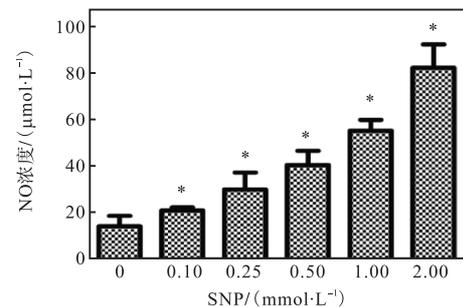


图 1 SNP 处理后细胞培养基中 NO 含量测定

Fig. 1 Concentrations of NO in culture medium after SNP treatment

为观察 SNP 对 MCF-7 细胞活性的影响, 进行 MTT 实验, 结果如图 2 所示。当 SNP 浓度低于 0.5 mmol/L 时, 对 MCF-7 细胞活性无显著抑制; 但 SNP 浓度高于 0.5 mmol/L 时, 活细胞数量明显下

降. 这表明高浓度 NO 抑制 MCF-7 细胞增殖.

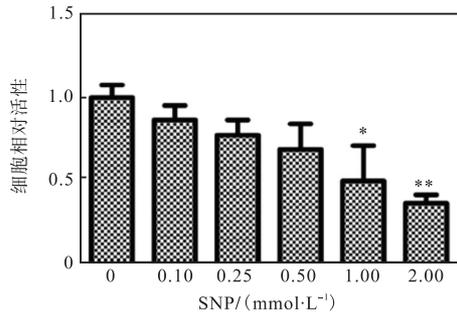


图2 SNP对MCF-7细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of SNP on MCF-7 cell proliferation

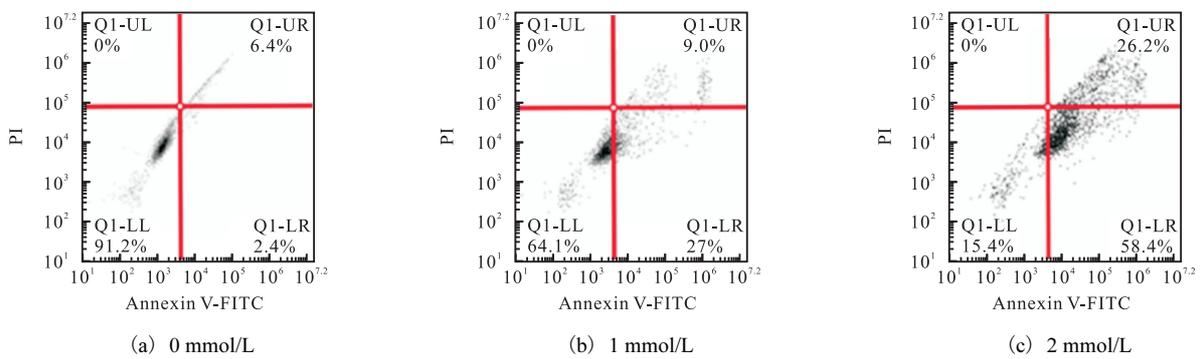


图3 高浓度SNP对MCF-7细胞凋亡的影响

Fig. 3 High concentration SNP inducing the apoptosis of MCF7 cells

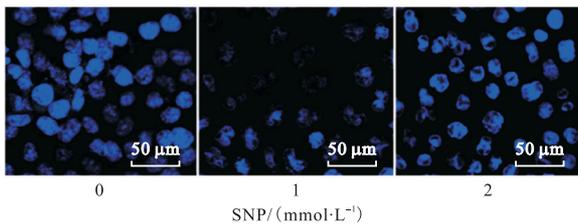


图4 Hoechst染色观察细胞核内DNA聚集状态

Fig. 4 DNA aggregation visualized with Hoechst staining

用 1 mmol/L 或 2 mmol/L SNP 处理后, MCF-7 细胞核明显皱缩, DNA 在核膜下聚集并出现“冒状”结构, 提示细胞凋亡发生. Hoechst 染色结果和 PI-Annexin V 检测结果一致, 证实 NO 供体 SNP 浓度高于 0.5 mmol/L 时诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡.

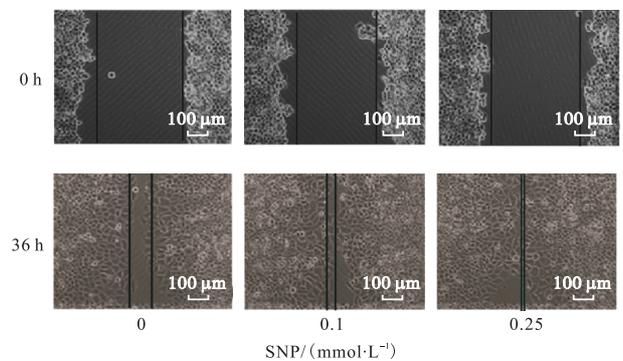
### 2.3 低浓度 NO 对 MCF-7 细胞迁移的影响

图 2—图 4 的结果证明: SNP 浓度高于 0.5 mmol/L 时具有细胞毒性, 诱导细胞凋亡. 为观察 NO 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响, 选择低浓度 SNP 处理细胞. 首先, 进行了划痕愈合实验. 结果显示: 与对照组相比, 当加入的 SNP 浓度低于 0.5 mmol/L 时, SNP 促进乳腺癌细胞系 MCF-7 的迁移(图 5).

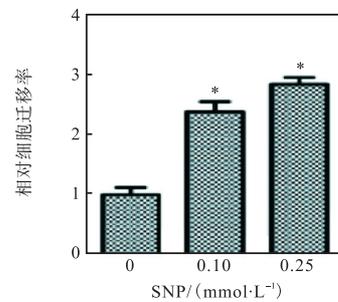
### 2.2 高浓度 NO 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

上述 MTT 实验结果显示, 当 SNP 浓度高于 0.5 mmol/L 时细胞活性降低. 在实验中观察到高浓度 SNP 处理导致细胞漂浮, 提示发生了细胞凋亡. 为了证明这一猜测, 首先, 通过流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, 结果如图 3 所示, 用 1 mmol/L 或 2 mmol/L SNP 处理 24 h 后, 凋亡细胞比率明显升高, 且与 SNP 浓度正相关, 表明高浓度 NO 诱导 MCF-7 细胞凋亡.

为了进一步确定 SNP 诱导 MCF-7 细胞凋亡, 采用 Hoechst 染色观察高浓度 SNP 对细胞核形态的影响, 结果如图 4 所示.



(a) 细胞划痕愈合实验结果



(b) 细胞迁移率分析

图5 划痕实验观察 SNP对MCF-7迁移的影响

Fig. 5 Wound-healing assay of SNP-treated MCF-7 cells

为了进一步证明此结果,则进行 Transwell 实验,结果如图 6 所示. SNP 浓度为 0.25 mmol/L 时可以明显促进 MCF-7 细胞的迁移,细胞迁移率增加至 3 倍左右,与划痕实验结果一致. 以上结果证明 SNP 对乳腺癌细胞 MCF-7 的影响取决于 SNP 浓度,提示低浓度 NO 促进 MCF-7 细胞迁移.

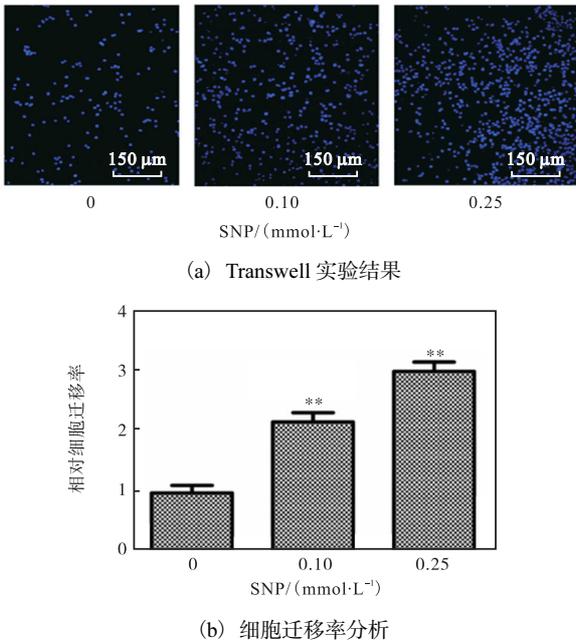


图 6 Transwell 实验观察 SNP 对 MCF-7 迁移的影响  
Fig. 6 Transwell assay of SNP-treated MCF-7 cells

#### 2.4 低浓度 NO 对迁移相关基因表达的影响

为了探究低浓度 NO 影响 MCF-7 细胞迁移的分子机制,用 0.1 mmol/L 或 0.25 mmol/L SNP 处理细胞,提取 RNA,利用 Real-time PCR 方法检测迁移相关基因 MYH9、MYL9 和 CYR61 的 mRNA 水平,结果如图 7 所示.

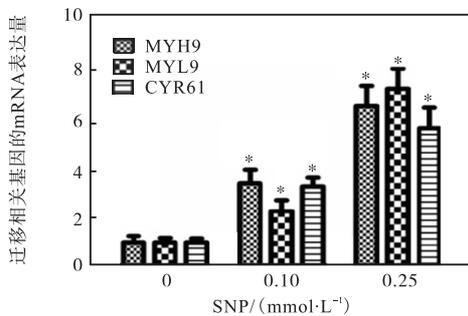


图 7 SNP 促进细胞迁移相关基因 mRNA 表达  
Fig. 7 SNP stimulated the expression of migration-related genes in MCF-7 cells

SNP 增强了迁移标志基因的表达. 结合图 5 和图 6 所示的细胞迁移率的变化可以推测,低浓度 NO

可能是通过上调细胞内迁移相关基因表达促进 MCF-7 的迁移.

#### 2.5 NO 清除剂对迁移相关基因表达的影响

血红蛋白(Hemoglobin, HB)是一种常用的 NO 清除剂. 为了证明 SNP 通过产生 NO 影响细胞迁移能力,用 HB 预处理细胞 1 h 后再加 0.25 mmol/L 的 SNP 继续处理 24 h,分别检测 mRNA 和蛋白表达水平. 结果如图 8 所示,0.25 mmol/L SNP 促进迁移相关基因表达(比较第 2 组与第 1 组),但 HB 处理后,SNP 不再促进迁移相关基因表达(比较第 3 组与第 1 组),因此推测 SNP 通过释放 NO 上调细胞迁移相关基因表达.

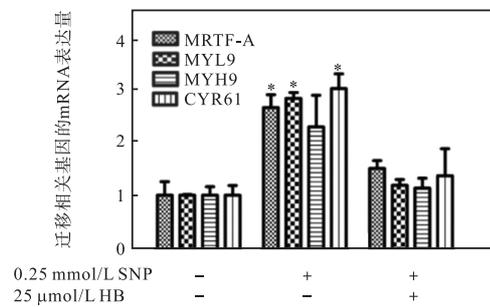


图 8 HB 消减 SNP 对迁移相关基因 mRNA 表达的上调作用  
Fig. 8 Effect of HB on SNP-induced upregulation of migration-related genes

前期研究证明 MYH-9、MYL-9 和 CYR61 基因表达受转录辅助因子 MRTF-A 调控<sup>[9]</sup>. 本实验也检测了 MRTF-A 表达水平,发现 0.25 mmol/L 的 SNP 促进 MRTF-A 表达(图 8). 此结果提示 MRTF-A 可能介导了 NO 对迁移相关基因 MYH-9、MYL-9 和 CYR61 表达的促进作用.

#### 2.6 敲低 NOS2 对 MRTF-A 及其调控的迁移相关基因表达的影响

乳腺癌细胞内源性 NO 的产生主要由诱导型一氧化氮合酶,即 iNOS/NOS2 催化. 为了证明细胞内源性 NO 在乳腺癌转移中的作用,本研究利用 siRNA 敲低 iNOS/NOS2,检测 MRTF-A 及其下游迁移相关基因的表达变化. 首先,检测 siRNA 工作效率,结果如图 9(a)所示,NOS2 的 3 个 siRNA 序列的敲低效率分别在 45%~65%. 选取敲低效率最高的 1<sup>#</sup>序列用于后续实验. 在此条件下,MRTF-A 及其靶基因的 mRNA 表达水平不同程度下降(图 9(b)),说明乳腺癌细胞内源性 NO 对迁移相关基因表达发挥促进作用.

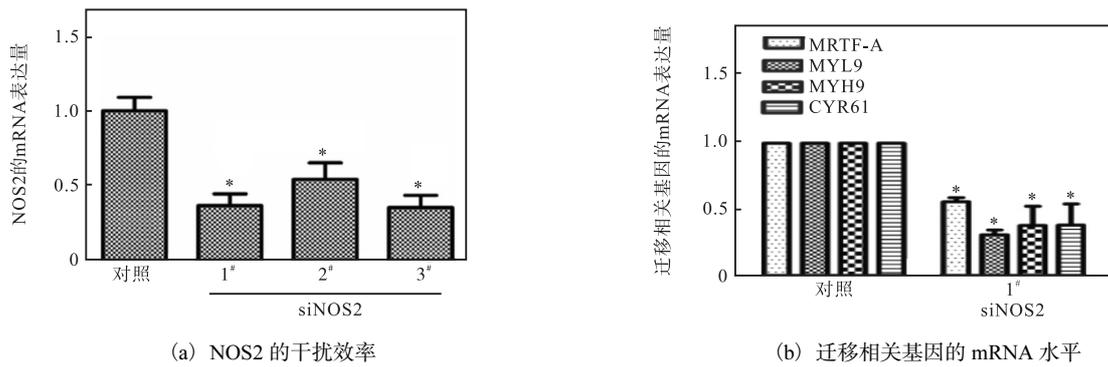


图 9 敲低 NOS2 对迁移相关基因 mRNA 表达的影响  
 Fig. 9 Effects of NOS2 knockdown on the mRNA expression of migration-related genes

### 2.7 敲低 MRTF-A 对 NO 诱导迁移相关基因表达的影响

MRTF-A 是迁移相关基因 MYH9、MYL-9 和 CYR61 表达的重要调控因子, 而且外源性和内源性 NO 均诱导 MRTF-A 表达(图 8 和图 9). 为了验证 NO 对迁移相关基因表达的影响是否与 MRTF-A 有关, 利用 shRNA 质粒敲低 MRTF-A, 再加入 0.25 mmol/L SNP 处理 12 h, 检测迁移相关基因表达的变化, 结果如图 10 所示.

转染 shMRTF-A 质粒导致 MRTF-A 的 mRNA 水平下降约 70% (图 10(a)), 蛋白水平也显著下降(图 10(c)); 转染 shMRTF-A 同时加 0.25 mmol/L SNP 处理后, 与对照组相比, MRTF-A 的 mRNA 水

平无明显下降(图 10(a)), 蛋白水平无明显变化(图 10(c)), 提示 shMRTF-A 抵消 SNP 对 MRTF-A 表达的促进作用.

同样条件下检测迁移相关基因表达(图 10(b) 和 (c)), 结果显示: 敲低 MRTF-A, MYH9、MYL-9 和 CYR61 的 mRNA 水平和蛋白水平均下降; 加 SNP 共处理组, 与对照组相比, MYH9、MYL-9 和 CYR61 的 mRNA 和蛋白水平均无明显变化. 此结果说明: MRTF-A 表达水平低时, 迁移相关基因表达下降; 而在 shMRTF-A 和 0.25 mmol/L SNP 共处理细胞中, MRTF-A 蛋白水平不变, 此时, SNP 不能诱导 MYH9、MYL9 和 CYR61 表达, 证明 MRTF-A 对 NO 促进迁移相关基因表达非常重要.

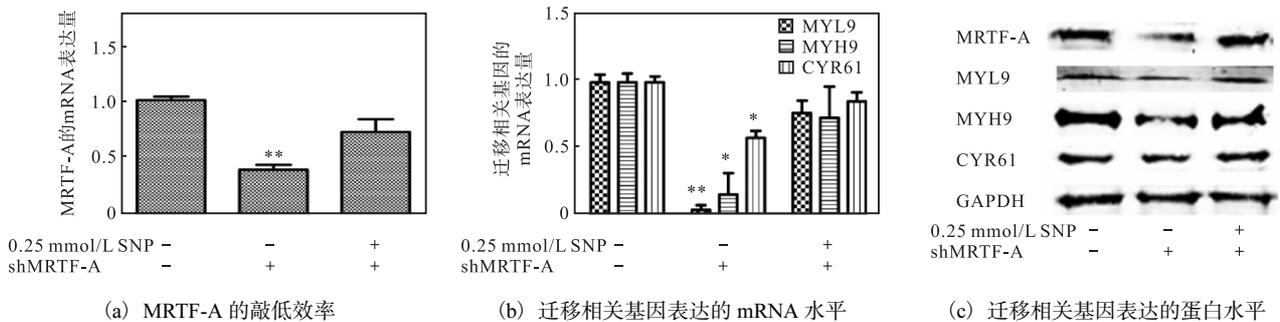


图 10 敲低 MRTF-A 同时加 SNP 对迁移相关基因表达的影响  
 Fig. 10 Effects of shMRTF-A and SNP co-treatment on the expression of migration-related genes

## 3 讨论

一氧化氮是重要的生物活性分子, 在生理和病理条件下都有重要作用. 在乳腺癌细胞中, 内源性 NO 主要由 iNOS 催化产生. 由于 iNOS 在肿瘤细胞中高表达, 而且 iNOS 表达水平与乳腺癌临床分期相关, 在恶性度高的组织中, iNOS 表达水平高<sup>[10-11]</sup>, 所以一般认为 NO 是促进癌细胞增殖和转移、促进肿瘤血

管增生的促癌因子, 使 iNOS 成为乳腺癌治疗的靶分子<sup>[12-16]</sup>. 但是, 也有研究<sup>[11,17]</sup>表明 NO 对肿瘤的影响取决于 NO 的浓度和肿瘤微环境, 高浓度 NO 诱导肿瘤细胞凋亡, 低浓度 NO 促进肿瘤细胞转移. 本研究结果也证实了这一现象. 关于低浓度 NO 促进癌细胞转移的分子机制颇为复杂, 目前有几种学说: (1) NO 激活肿瘤细胞内多个信号途径, 如 PI3 K/PKB 信号途径、MAPK 信号途径、EGFR 信号途径等促进肿瘤细胞发生上皮-间质表型转化, 增强肿瘤细胞转移能

力; (2) NO 增强缺氧诱导因子 HIF 蛋白稳定性, 促进肿瘤组织血管形成; (3) NO 调节细胞外基质金属蛋白酶活性, 改变肿瘤微环境, 促进肿瘤侵袭和转移; (4) 调节肿瘤细胞代谢<sup>[16,18]</sup>. 基于低浓度 NO 在肿瘤发病中的作用, iNOS 被认为是乳腺癌治疗的靶分子<sup>[19]</sup>.

本课题组前期研究证明转录辅助因子 MRTF-A 调控的迁移相关基因表达在乳腺癌转移中发挥重要作用<sup>[11]</sup>. 为探索 MRTF-A 在 NO 诱导乳腺癌转移中的作用, 检测了 NO 对转录调控因子 MRTF-A 及其下游的迁移标志基因 MYH9、MYL9 和 CYR61 表达的影响, 发现低浓度 NO 促进 MRTF-A 及其下游靶基因的表达, 而 NO 对这些基因表达的促进作用依赖于 MRTF-A 的存在. 此结果提示利用 siRNA 敲低 MRTF-A 表达水平或用小分子化合物抑制 MRTF-A 活性可能对 iNOS 高表达的乳腺癌转移有抑制作用.

浸润性生长和远距离转移是包括乳腺癌在内恶性肿瘤的病理特征, 也是恶性肿瘤致死的主要原因. 探究在乳腺癌转移的分子机制对于乳腺癌的预防和治疗具有重要意义. 本研究主要在细胞水平和分子水平初步探索了 MRTF-A 在 NO 诱导乳腺癌转移中的作用, 下一步将进行更深入的分子机制研究和动物水平研究, 以期为乳腺癌治疗提供新的思路.

#### 参考文献:

- [ 1 ] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(13): 668-674.
- [ 2 ] Lintz M, Munoz A, Reinhart-King C A. The mechanics of single cell and collective migration of tumor cells[J]. Journal of Biomechanical Engineering, 2017, 139(2): 021005.
- [ 3 ] Burke A J, Sullivan F J, Giles F J, et al. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 503-512.
- [ 4 ] Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer[J]. Redox Biology, 2015, 6: 334-343.
- [ 5 ] Basudhar D, Bharadwaj G, Somasundaram V, et al. Understanding the tumour micro-environment communication network from an NOS2/COX2 perspective[J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(2): 155-176.
- [ 6 ] Ehrenfeld P, Cordova F, Duran W N, et al. S-nitrosylation and its role in breast cancer angiogenesis and metastasis[J]. Nitric Oxide, 2019, 87: 52-59.
- [ 7 ] Peak T C, Richman A, Gur S, et al. The role of PDE5 inhibitors and the NO/cGMP pathway in cancer[J]. Sexual Medicine Reviews, 2016, 4(1): 74-84.
- [ 8 ] Salimian R B, Achreja A, Nagrath D. Nitric oxide: The forgotten child of tumor metabolism[J]. Trends in Cancer, 2017, 3(9): 659-672.
- [ 9 ] Scharenberg M A, Chiquet-Ehrismann R, Asparuhova M B. Megakaryoblastic leukemia protein-1(MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis[J]. The International Journal of Biochemistry Cell Biology, 2010, 42(12): 1911-1914.
- [ 10 ] Hu Q, Guo C, Li Y, et al. LMO7 mediates cell-specific activation of the Rho-myocardin-related transcription factor-serum response factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration[J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(16): 3223-3240.
- [ 11 ] He H, Wang D, Yao H, et al. Transcriptional factors p300 and MRTF-A synergistically enhance the expression of migration-related genes in MCF-7 breast cancer cells[J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2015, 467(4): 813-820.
- [ 12 ] Meng C, He Y, Wei Z, et al. MRTF-A mediates the activation of COL1A1 expression stimulated by multiple signaling pathways in human breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 718-728.
- [ 13 ] 张剑, 何生. 一氧化氮在肿瘤生长转移中的作用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2004(6): 561-563.
- [ 14 ] 汪礼坤, 鲁智, 王圣应. 一氧化氮合酶与浸润性乳腺癌血管形成的关系及临床意义[J]. 肿瘤防治杂志, 2005(3): 186-189.
- [ 15 ] 雷铭道, 郑丽丽, 张玲, 等.  $\alpha$ -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(1): 1-4.
- [ 16 ] Basudhar D, Somasundaram V, de Oliveira G A, et al. Nitric oxide synthase-2-derived nitric oxide drives multiple pathways of breast cancer progression[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2017, 26(18): 1044-1058.
- [ 17 ] Cheng H, Wang L, Mollica M, et al. Nitric oxide in cancer metastasis[J]. Cancer Letters, 2014, 353(1): 1-7.
- [ 18 ] Flaherty R L, Intabl H, Falcinelli M, et al. Stress hormone-mediated acceleration of breast cancer metastasis is halted by inhibition of nitric oxide synthase[J]. Cancer Letters, 2019, 459: 59-71.
- [ 19 ] Chang C F, Diers A R, Hogg N. Cancer cell metabolism and the modulating effects of nitric oxide[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 79: 324-336.

责任编辑: 郎婧