

徐明飞,张怡,康如意,等. EFHD2 调节 NOX4/ROS 通路启动糖代谢重编程促进乳腺癌进展的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 66-75.

Xu MF, Zhang Y, Kang RY, et al. EFHD2 regulates the NOX4/ROS pathway to initiate glucose metabolism reprogramming and promote breast cancer progression [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 66-75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.008

EFHD2 调节 NOX4/ROS 通路启动糖代谢重编程促进乳腺癌进展的机制研究

徐明飞¹, 张怡³, 康如意³, 刘超越^{2*}

(1.川北医学院基础医学与法医学院人体解剖学教研室,四川南充 637000;2.川北医学院基础医学与法医学院免疫学教研室,四川南充 637000;3.川北医学院临床医学院,四川南充 637000)

【摘要】 目的 基于 NOX4/ROS 信号通路探讨 EFHD2 影响乳腺癌发生进展的作用机制。方法 将细胞分为 NC-shRNA 组和 EFHD2-shRNA 组,构建沉默 EFHD2 表达的慢病毒载体及其对照载体后转染乳腺癌细胞 MDA-MB-23、MCF-7, qRT-PCR 验证转染效率; CCK8 检测细胞增殖活性; 平板克隆实验检测细胞集落形成能力; 划痕实验检测细胞迁移; Transwell 实验检测细胞侵袭; 流式细胞术检测细胞凋亡及 ROS 水平; qRT-PCR 检测 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH mRNA 的表达; Western blot 检测 Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 蛋白的表达。结果 与 NC-shRNA 组相比, EFHD2-shRNA 组细胞中 EFHD2 的表达明显降低, 细胞存活及其集落形成能力减弱; 细胞凋亡率及促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达升高; 细胞迁移距离缩短, 细胞侵袭数及促迁移、侵袭蛋白 MMP-2 的表达降低; 乳酸及 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、LDH 的水平降低, ATP 及 PDH 的水平升高; 流式结果表明沉默 EFHD2 后 ROS 水平降低, NOX4 蛋白下调。结论 EFHD2 可通过调节 NOX4/ROS 信号通路, 抑制 ROS 生成, 引起乳酸及葡萄糖堆积从而促进乳腺癌细胞凋亡, 抑制细胞增殖、迁移及侵袭。

【关键词】 乳腺癌; 代谢重编程; NOX4/ROS 信号通路; EFHD2; 免疫逃逸

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0066-10

EFHD2 regulates the NOX4/ROS pathway to initiate glucose metabolism reprogramming and promote breast cancer progression

XU Mingfei¹, ZHANG Yi³, KANG Ruyi³, LIU Chaoyue^{2*}

(1. Department of Human Anatomy, Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China. 2. Department of Immunology, Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000. 3. School of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism by which EFHD2 affects the occurrence and progression of breast cancer based on the NOX4/ROS signaling pathway. **Methods** Cells were divided into an NC-shRNA group and EFHD2-shRNA group. A lentiviral vector for EFHD2 silencing and a control vector were constructed and used to transfect

【基金项目】 四川省科技厅项目 (2024NSFSC1277); 南充市科学技术局项目 (20SXQT0333); 大学生创新创业国家级项目 (202310634020); 大学生创新创业省级项目 (202310634040)。

【作者简介】 徐明飞 (1987—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向: 乳腺癌。E-mail: 289112406@qq.com

【通信作者】 刘超越 (1988—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 病毒与肿瘤。E-mail: liuchaoyue@nsmc.edu.cn

MDA-MB-23 and MCF-7 breast cancer cells. The transfection efficiency was verified by qRT-PCR. A CCK8 assay was used to detect cell proliferation activity. A plate cloning assay was employed to measure cell colony formation ability. A scratch test was used to detect cell migration, and a Transwell assay used to assess cell invasion. Flow cytometry was applied to detect apoptosis and ROS levels. qRT-PCR was used to analyze the mRNA expression of GLUT1, PDK1, PFK1, PKM2, PDH, and LDH, while Western blot was applied to detect the expression of Cleaved caspase-3, MMP-2, and NOX4 proteins. **Results** Compared with the NC-shRNA group, the EFHD2-shRNA group's EFHD2 expression was significantly decreased and its cell survival and colony formation ability were weakened. The apoptosis rate and the expression of the pro-apoptotic protein Cleaved caspase-3 increased. The cell migration distance was shortened, while the number of invading cells and the expression of MMP-2, which promotes migration and invasion, were decreased. The levels of lactic acid and GLUT1, PDK1, PFK1, PKM2, and LDH decreased, while the levels of ATP and PDH increased. Streaming result showed that ROS levels were reduced and NOX4 protein was down-regulated after silencing EFHD2. **Conclusions** EFHD2 inhibits ROS production by regulating the NOX4/ROS signaling pathway, causing lactic acid and glucose accumulation, promoting the apoptosis of breast cancer cells, and inhibiting cell proliferation, migration, and invasion.

[Keywords] breast cancer; metabolic reprogramming; NOX4/ROS signaling pathway; EFHD2; immune escape

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

乳腺癌是很常见的恶性肿瘤之一,在女性癌症中其发病率位居第一^[1]。手术通常是乳腺癌治疗的首选。大多数妇女可能会接受额外的治疗,包括化疗、激素治疗、放疗或靶向治疗^[2-3]。90%以上的乳腺癌在确诊时没有发生转移^[4]。然而,据估计,近 30% 的早期乳腺癌患者将发展为转移性乳腺癌^[5],这些患者的中位生存期为 8~36 个月^[6]。由此可见,乳腺癌已成为女性健康的第一杀手,不可忽视。由于我们对乳腺癌的理解取得了实质性进展,对乳腺癌的早期诊断和治疗取得了重大突破,被诊断出患有乳腺癌的女性能够获得更加适当的治疗,因此与过去相比,乳腺癌的死亡风险有所降低^[7]。但是研究表明转移性乳腺癌的死亡率仍然没有降低。由于乳腺癌在形态学和遗传学上的高度异质性,部分早期乳腺癌患者仍会出现复发转移^[8]。迄今为止,晚期乳腺癌依然是难以完全治愈的,且乳腺癌复发和预后会严重影响患者生存率^[9]。因此,探索乳腺癌分子转移机制,由此开发筛选乳腺癌特异性诊断的分子标志物和靶向治疗位点,对乳腺癌的早期预防、防止复发、延长患者的生存周期和改善生活品质具有重要意义。

螺旋-环-螺旋拓扑结构域蛋白 D2 (helix-loop-helix topology protein D2, EFHD2) 是一种钙结合蛋白,主要参与钙信号转导细胞骨架组装和突触形成^[10]。EFHD2 在各种细胞类型中广泛表达,在肿瘤侵袭转移、细胞凋亡、钙离子信号通路、体液免疫等多种生理病理过程中发挥着重要的调控作用^[11]。近年来随着治疗方法的优化,乳腺癌患者的预后已

得到明显改善,但其复发和转移是导致患者死亡的重要原因,这与乳腺癌细胞免疫逃逸发生有关,但截至目前其具体调控机制尚不清楚。研究证明代谢重编程介导的微环境免疫抑制是肿瘤复发转移、化疗抵抗和免疫逃逸的关键^[12],近年来 NOX4 在肿瘤的研究中受到关注,其在乳腺癌中高表达,且促进乳腺癌发展^[13]。NOX4/ROS 通路介导的能量代谢重编程可为肿瘤细胞增殖和迁移提供能量和物质供应,而代谢产物乳酸造成的酸性微环境可引起微环境免疫抑制并造成免疫逃逸^[11]。NOX4 产生的 ROS 通过 HIF-1 α 激活胶质母细胞瘤中转录因子 FOXM1 促进有氧糖酵解^[14]。在非小细胞肺癌中,NOX4 调控 ROS/PI3K/AKT 影响糖酵解,其抑制剂与糖酵解抑制剂协同抑制癌细胞^[15]。此外,NOX4 蛋白表达影响夹竹桃麻素药物干预小鼠的正常脂代谢、NOX2 蛋白表达下降、肝组织内三酰甘油和高密度脂蛋白胆固醇浓度下降^[16]。为此,本研究基于 NOX4/ROS 信号通路,分析沉默 EFHD2 对脂代谢重编程及乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,探讨 EFHD2 对乳腺癌细胞免疫逃逸的作用机制,为乳腺癌病情诊断和治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞

人乳腺癌细胞 MDA-MB-23、MCF-7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0150、CL-0149。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、MCF-7 细胞专用培养基、

MEM(含 NEAA)培养基(Procell,货号:PM150210、CM-0149、PM150410);胎牛血清(Vivacell,货号:C04001-500);双抗(上海源培,货号:S110JV);CCK8 试剂盒(Biosharp,货号:BS350B);Annexin V-APC 双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基,货号:KGA1030);活性氧检测试剂盒(碧云天,货号:S0033S);胰酶(+EDTA)(上海源培,货号:S310JV);胰酶(-EDTA)(Bomei,货号:BMB1127);慢病毒(汉恒生物);总蛋白、ATP、乳酸(LD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A045-2-1、A095-1-2、A019-2-1);Molpure® Cell/Tissue Total RNA Kit(YEASEN 公司,货号:19221ES50);PrimeScript RT reagent Kit(宝日医生物技术有限公司,货号:RR047A);TB Green TM Premix Ex Taq™ II(宝日医生物技术有限公司,货号:RR820A);DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,货号:ZLI-9018);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0009);Western blot 相关 β -actin、MMP-2、NOX4 抗体(abclonal,货号:AC026、A6247、A11274);Cleaved caspase-3 抗体(Cell Signaling,货号:9661);二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP(Affbiotech,货号:S0001)。

电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司,型号:DZKW-4);高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:KZ-III-F);酶标仪(美谷分子仪器有限公司,型号:SpectraMAX Plus384);UV752N 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司,型号:UV752N);台式低温离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,型号:TDZ4-WS);CO₂ 培养箱(Thermo,型号:311);流式分析仪(Beckman,型号:Cytoflex);压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂,型号:DSX-280B);超净工作台(力康精密科技有限公司,型号:OptiClean 1300);实时荧光定量(RT-PCR)仪(ThermoFisher,型号:QuantStudio TM3);旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司,型号:XH-B);垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-SCZ4+);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY200C);数显水平摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:DS-H200);荧光图像分析系统(Tanon,型号:5200 Multi)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

快速解冻乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-

7,然后用 DMEM 完全培养基(加入 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素)培养,调节细胞密度为 3×10^4 /mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养。

1.3.2 慢病毒感染及分组

沉默 EFHD2 表达的慢病毒(EFHD2-shRNA)及其对照慢病毒(NC-shRNA)由上海汉恒生物科技有限公司负责构建。将细胞随机分为 NC-shRNA 组和 EFHD2-shRNA 组,将对数生长的细胞经胰酶消化并制成 3×10^4 /mL 的细胞悬液,分别吸取 2 mL 细胞悬液置于 6 孔板中,将感染试剂与完全培养基混合并预留加入病毒液体积,根据病毒滴度,加入相应病毒量,按照分组感染,37 °C、5% CO₂ 恒温培养。感染后 24 h 后用完全培养基进行换液,37 °C、5% CO₂ 恒温培养 48 h。根据分组,吸取上层清液于对应编号的离心管中备用,PBS 洗涤细胞 1 次,吸弃上清。胰酶消化,于 37 °C 下消化至细胞边缘离壁,加入已收集的细胞上清液终止消化并收集于对应离心管中,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,加入适量 PBS 洗涤并将悬液转移至 1.5 mL 尖底 EP 管中,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清,获得细胞沉淀,用于 PCR 验证。

1.3.3 CCK8 检测细胞增殖活性

取转染后的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞,PBS 洗涤,胰酶消化后培养为细胞悬液,调节细胞密度 5×10^4 /mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,37 °C、5% CO₂ 恒温培养。培养 24 h 后,吸弃上清。无血清培养基 1:10 稀释 CCK8 试剂,加入已稀释 CCK8 工作液每孔 110 μ L;37 °C、5% CO₂ 培养 2 h。测定 450 nm 波长处各孔的吸光值。

1.3.4 平板克隆实验检测细胞集落形成能力

将细胞悬液以每皿 1800 个细胞密度分别接种于含 2 mL 37 °C 预热培养液的 35 mm 皿中,轻轻吹打,使细胞分散均匀;37 °C、5% CO₂ 恒温培养。结晶紫染色后在显微镜下观察到单个细胞长到 50 个以上细胞克隆,6 孔板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 轻柔洗涤 2 次。加入纯乙醇,固定 30 min 后,去除固定液,PBS 洗涤 1 次,吸除上清液,0.1% 结晶紫染色 15~20 min,PBS 洗去多余结晶紫,空气干燥,收集拍照采集图像,用肉眼直接计数克隆。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移

在 6 孔板背后用每隔约 0.5~1 cm 画一道横

线,每孔至少穿过 5 条线。待细胞长满至单层,200 μL 移液枪垂直于背后横线划痕;PBS 洗涤 2 次,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养 24 h。0、24 h 时间点取样,50 倍镜跟踪拍摄各孔细胞划痕状态。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞侵袭

用预温的无血清培养基重悬细胞,调节细胞密度 $2\times 10^5/\text{mL}$ 。在下室(即 24 孔板底部)板中加入 600 μL 含 20% FBS 的完全培养基,将小室放入板中;在 Transwell 小室中加入 200 μL 的细胞悬液,放于孵箱中继续培养 24 h,固定上室细胞,以结晶紫染色后在光学显微镜下观察各组上室图像,经 Image J 软件分析定量其每组数目,即为每组侵袭数。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡及 ROS 水平

细胞胰酶(不含 EDTA)消化,250 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤转移,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清,获得细胞沉淀。细胞凋亡检测用 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V、5 μL 的 PI 混匀避光反应 15 min,上机检测分析。ROS 检测每管加入 1 mL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,3~5 min 颠倒混匀 1 次,350 r/min 离心 5 min,吸弃上清,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次。阳性对照组装载探针加入 1 mL 的 Rosup 稀释液(1:1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,350 r/min 离心 5 min,吸弃上清,加入 PBS 重悬,上机检测分析。

1.3.8 qRT-PCR 检测 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH mRNA 的表达

按照制造商的说明,使用 TRIzol 试剂从细胞中提取 RNA,逆转录获得 cDNA,使用 Fast SYBR[®] Green Master Mix 和实时荧光定量(RT-PCR)仪进行 qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对表达量,以 GAPDH 作为内参。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜索基因全序列,使用 Primer Premier 引物设计软件设计筛选各基因特异性引物,相关基因的引物序列信息如表 1 所示。

1.3.9 Western blot 检测 Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 的表达

提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,孵一抗(Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 抗体 1:1000 稀释; β -actin 抗体 1:50 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,孵辣根过氧化物酶标记二抗 IgG(1:5000 稀释)室温 1.5 h,用 ECL 化学发光试剂盒显影, β -actin 作为内参,用 Tanon 荧

光图像分析系统软件 V2.0 对条带进行曝光,结果以 Gel-Pro analyzer4 软件扫描曝光结果,并以目的蛋白积分光密度(IOD)表示。

1.4 统计学方法

各组数值均用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,用 Graphpad prism 8.0 软件进行绘图。两组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐用最小差数(LSD)法比较,方差不齐用 Tamhane's 比较,以 $P<0.05$ 作为评定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞行为学的影响

2.1.1 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞增殖的影响

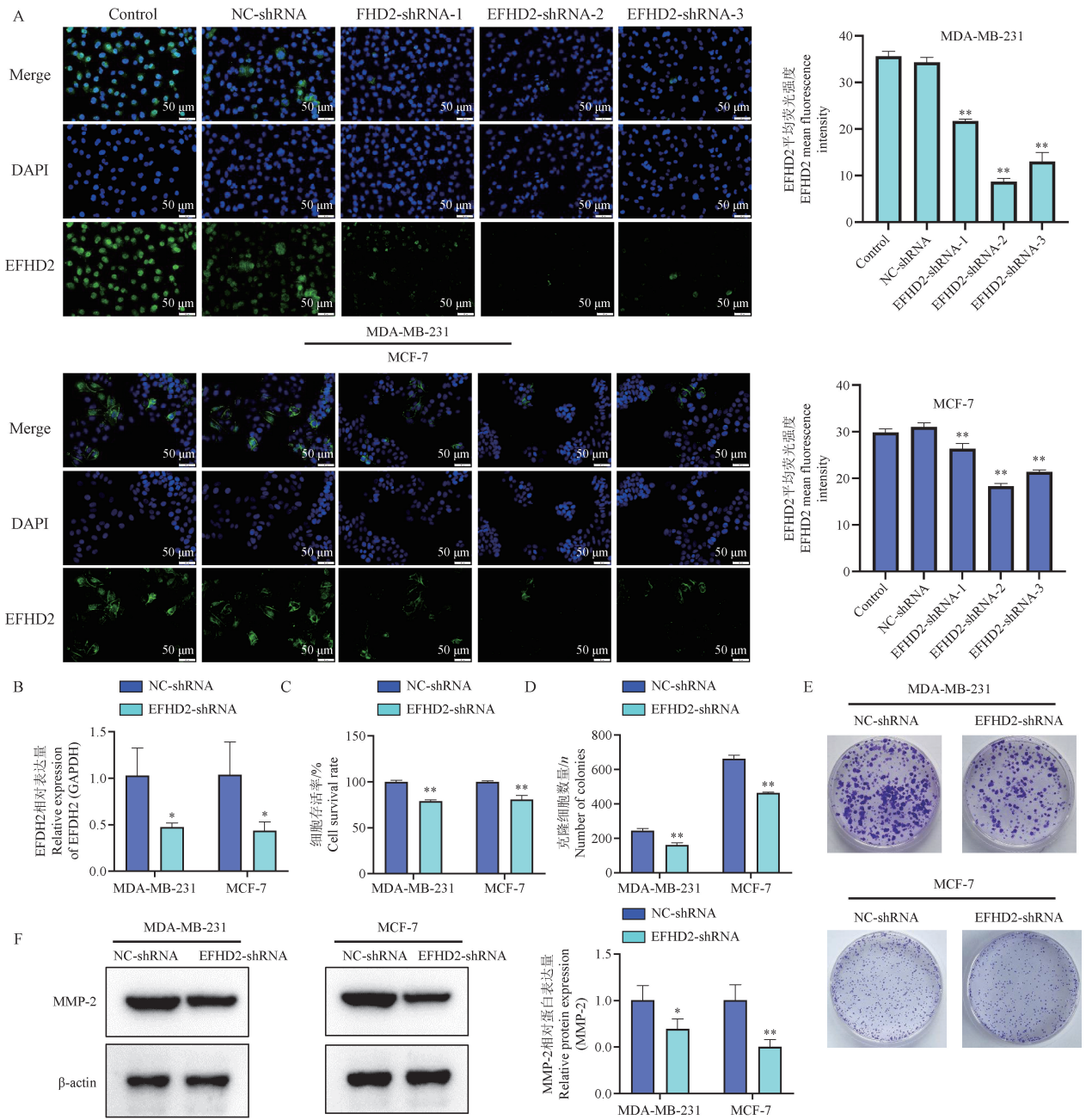
采用免疫荧光的进行 shRNA 下调 EFHD2 的序列设计蛋白表达的验证,同时设计观察 2~3 条 EFHD2-shRNA 干扰效率(图 1A)。EFHD2-shRNA2 构建沉默 EFHD2 表达的载体及对应空载体,用慢病毒感染乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 MCF-7,并通过 qRT-PCR 实验验证各组细胞中 EFHD2 的表达情况,结果显示,与 NC-shRNA 组比较,MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的 EFHD2-shRNA 组中 EFHD2 mRNA 的表达均显著下调($P<0.05$),表明转染成功(图 1B)。通过 CCK8 检测细胞增殖活力发现 EFHD2-shRNA 组的细胞存活率较其对照组明显降低($P<0.01$)(图 1C),平板克隆形成实验结果表明与 NC-shRNA 组相比沉默 EFHD2 的 EFHD2-shRNA 组细

表 1 qRT-PCR 检测基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes detected by qRT-PCR	
基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GAPDH	F: TGACTTCAACAGCGACACCCA; R: CACCGTGTGCTGTAGCCAAA
EFHD2	F: GACATGGAGAAGATGTTCAAGC; R: TCCATCATGAGTTTTAGCTCCA
GLUT1	F: ATGAAGGAAGAGACTCGGCAGATG; R: AGCACCACAGCGATGAGGATG
LDH	F: AGGTGATCAAACCTCAAAGGCTA; R: CCCAAATGCAAGGAACACTAA
PDH	F: AAGAGAACTAGAACGGCTGAAA; R: CATCTCCAAATGCCCTAAATGG
PDK1	F: GCCACTATGGAACACCATGCCAACAG; R: AACGCCACCTCCTCGGTCATCAT
PFK1	F: TTGTCCATGAGGGTTATCAAGC; R: ATGACACAGAGATTGGTGATCC
PKM2	F: ACTGGCATCATCTGTACCATTG; R: AGCCACATTCATTCCAGACTTA

胞的集落形成明显减弱 ($P<0.01$) (图 1D、1E); 通过 Western blot 实验检测 MMP2 的表达, 2 结果显示, 与 NC-shRNA 组比较, MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的 EFHD2-shRNA 组中 MMP2 蛋白的表达均显著下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (图 1F)。

2.1.2 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞凋亡的影响
慢病毒转染 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞后用流式细胞术检测细胞凋亡, 结果表明, 与 NC-shRNA 组比较, 沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组的细胞凋亡率明显上调 ($P<0.01$) (图 2A、2B); 通过



注: A:免疫荧光检测 EFHD2-shRNA 干扰效率;B;qRT-PCR 检测 EFHD2 mRNA 的表达;C:CCK8 检测细胞增殖活性;D、E:结晶紫染色检测各组细胞集落生成;F:蛋白免疫印记实验检测 MMP2 蛋白的表达。与 NC-shRNA 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞中 EFHD2 的表达及细胞增殖的影响

Note. A, EFHD2-shRNA interference efficiency was measured by immunofluorescence. B, EFHD2 mRNA expression was detected by qRT-PCR. C, Cell proliferation activity was detected by CCK8 assay. D/E, Crystal violet staining was used to detect cell colony formation in each group. F, MMP2 protein expression was detected by Western blot. Compared with NC-shRNA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effect of EFHD2 silencing on EFHD2 expression and cell proliferation in breast cancer cells

Western blot 实验检测细胞凋亡标志蛋白 Cleaved caspase-3 的表达发现,与 NC-shRNA 组相比,EFHD2-shRNA 组细胞中促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达明显升高($P<0.05$)(图 2C)。

2.1.3 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞迁移及侵袭的影响

通过划痕实验和 Transwell 实验分别检测细胞迁移及侵袭,结果发现与 NC-shRNA 组比较,沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组的细胞迁移距离与侵袭数降低($P<0.01$)(图 3A、3B)。通过 Western blot 实验检测与细胞迁移及侵袭相关的蛋白 MMP-2 的表达发现,与 NC-shRNA 组相比,EFHD2-shRNA 组 MMP-2 蛋白的表达在 MDA-MB-231 细胞中显著下调($P<0.05$),在 MCF-7 细胞中明显下调($P<0.01$)(图 3C)。

2.2 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞代谢重编程的影响

利用生化试剂盒检测乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中乳酸及 ATP 的含量,结果表明与 NC-shRNA 组比较,沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组中乳酸的含量明显降低,ATP 的含量明显升高($P<0.01$)(见图 4)。

利用 qRT-PCR 实验检测乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中与代谢重编程调控的相关代谢酶

GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH 的表达,结果表明与 NC-shRNA 组比较,沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组中 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2 及 LDH mRNA 的表达明显降低,PDH 的表达明显升高($P<0.05$)(见图 5)。

2.3 EFHD2 沉默对 NOX4/ROS 通路的影响

通过流式细胞术检测 ROS 的水平发现,与 NC-shRNA 组相比,EFHD2-shRNA 组的 ROS 含量明显降低($P<0.01$)(图 6A、6B);通过 Western blot 实验检测 NOX4 的表达发现,沉默 EFHD2 后 NOX4 蛋白在乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中的表达明显下调($P<0.01$)(图 6C)。

3 讨论

机体免疫系统具有免疫监视功能,免疫系统能够识别并通过免疫机制抵御肿瘤的发生发展^[17]。原发性 and 转移性肿瘤是一个复杂的生态系统,由肿瘤细胞、细胞外基质和肿瘤基质(非肿瘤细胞)组成,其中包括特异性间充质支持细胞、内皮细胞和浸润的炎症免疫细胞^[18]。癌细胞和辅助细胞之间的串扰促进和塑造了肿瘤的发展,从而导致肿瘤免疫逃避发生、发展^[19]。近年来,肿瘤细胞合成代谢和分解代谢均发生了适应性变化,即“代谢重编程”

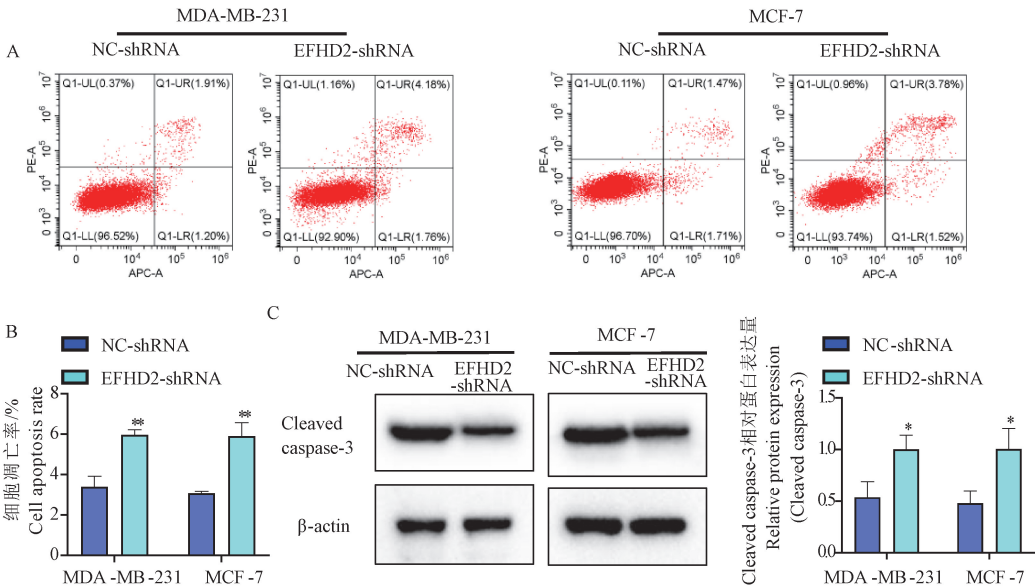
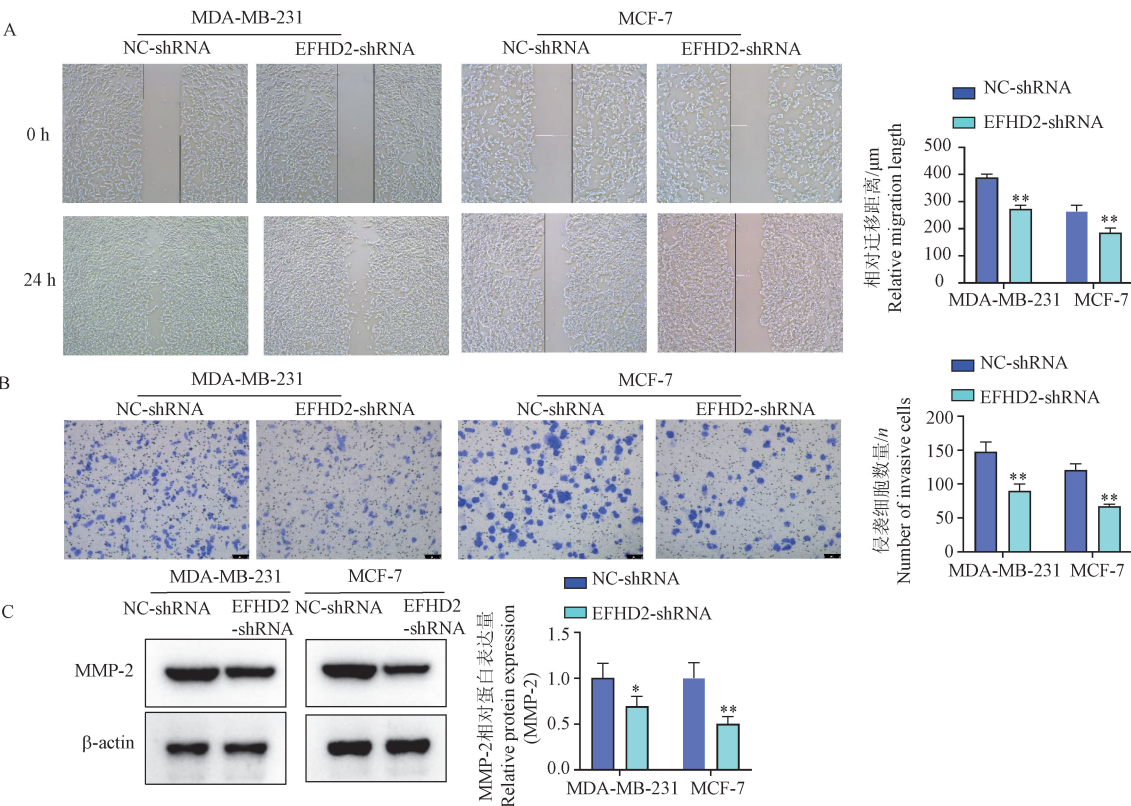


图2 沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞凋亡的影响

Note. A/B, Results of cell apoptosis detected by flow cytometry. C, Western blot was used to detect the expression of Cleaved caspase-3. Compared with NC-shRNA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of silencing EFHD2 on apoptosis of breast cancer cells

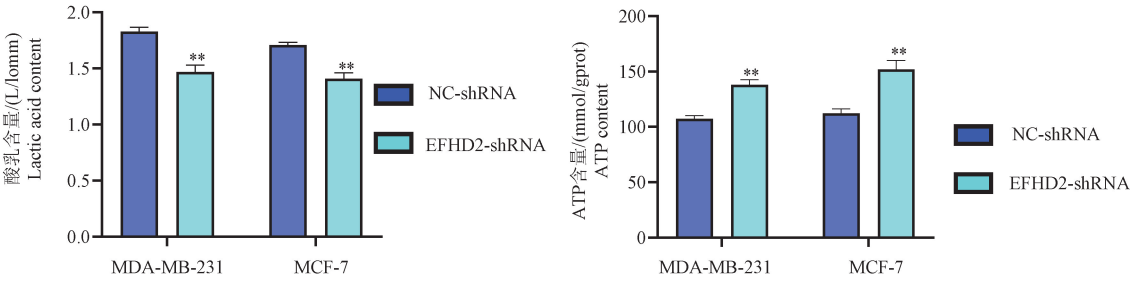


注:A:划痕实验检测各组细胞迁移;B:Transwell 实验检测各组细胞侵袭;C:Western blot 检测细胞迁移及侵袭相关蛋白 MMP-2 的表达。与 NC-shRNA 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞迁移及侵袭的影响

Note. A, Scratch test was used to detect cell migration in each group. B, Transwell assay was used to detect cell invasion in each group. C, Western blot was used to detect the expression of MMP-2, a protein related to cell migration and invasion. Compared with NC-shRNA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effect of silencing EFHD2 on migration and invasion of breast cancer cells



注:与 NC-shRNA 组比较, ** $P<0.01$ 。

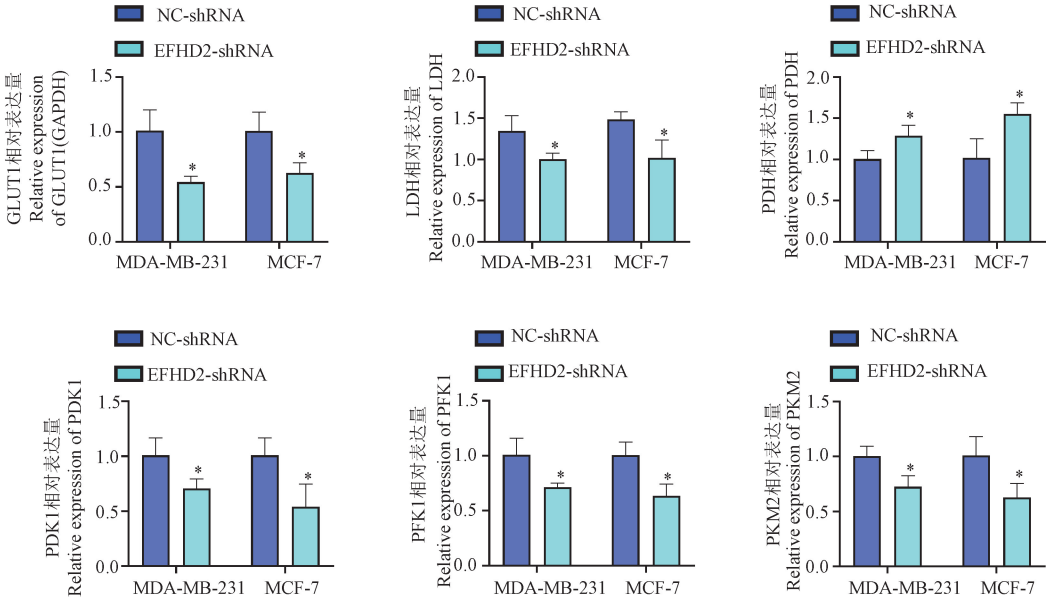
图 4 各组乳腺癌细胞中乳酸及 ATP 的含量比较

Note. Compared with NC-shRNA group, ** $P<0.01$.

Figure 4 Comparison of lactate and ATP contents in breast cancer cells of each group

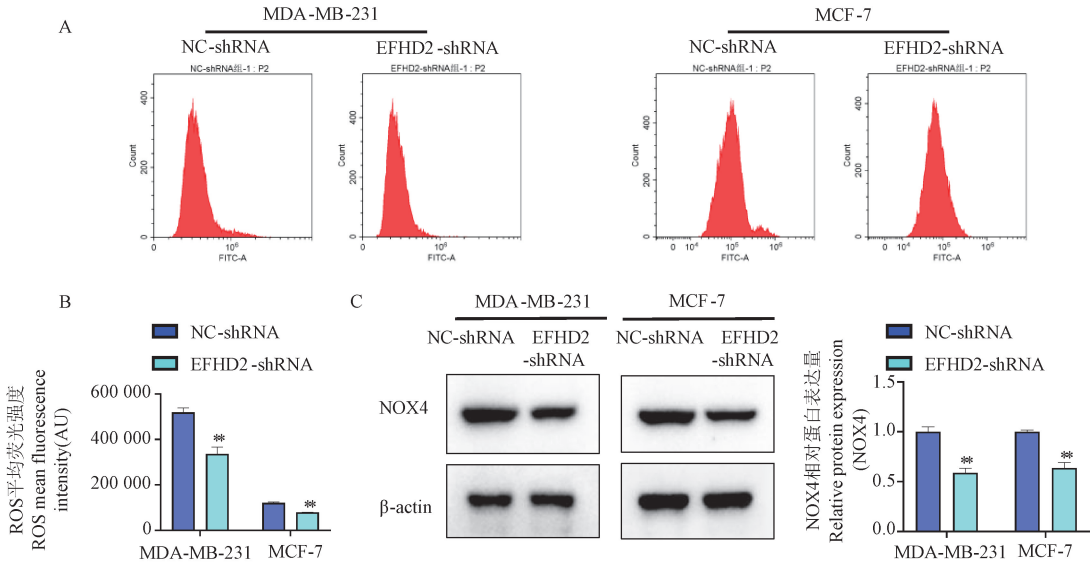
为肿瘤免疫治疗提供了新思路^[19]。代谢重编程是指细胞对能量来源偏好(葡萄糖、脂肪酸或酮类)的改变,包括有氧糖酵解增强、葡萄糖摄取和消耗增加、脂类和蛋白质合成加强,以及谷氨酰胺摄取和分解代谢增加,满足肿瘤快速增殖的需求^[20]。Warburg 效应是肿瘤细胞在氧气充足的条件下仍以

糖酵解的方式代谢葡萄糖和产生乳酸,使肿瘤微环境呈现缺氧、低 pH 和代谢物蓄积的特征,促进了肿瘤微环境的免疫抑制能力和免疫逃逸的发生^[21]。糖酵解(glycolysis)是指在无氧条件下,葡萄糖在细胞质中被分解成为丙酮酸的过程,其中丙酮酸脱氢酶(PDH)、乳酸脱氢酶(LDH)和 M2 型丙酮酸激酶



注:与 NC-shRNA 组比较, * $P<0.05$ 。
图 5 qRT-PCR 实验检测 GLUT1、LDH、PDH、PDK1、PFK1 和 PKM2 mRNA 的表达
Note. Compared with NC-shRNA group, * $P<0.05$.

Figure 5 qRT-PCR assay to detect mRNA expression of GLUT1, LDH, PDH, PDK1, PFK1 and PKM2



注:A、B:流式细胞术检测 ROS 的结果;C:Western blot 检测 NOX4 蛋白的表达。与 NC-shRNA 组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 沉默 EFHD2 对 NOX4/ROS 通路的影响

Note. A/B, Results of ROS detection by flow cytometry. C, Western blot analysis of NOX4 protein expression. Compared with NC-shRNA group, ** $P<0.01$.

Figure 6 Effect of silencing EFHD2 on the NOX4/ROS pathway

(M2 pyruvate kinase, PKM2)是糖降解过程中重要的代谢酶^[22]。研究表明 PKM2 的高表达在肿瘤的增殖、侵袭转移中起重要作用^[23]。丙酮酸脱氢酶 1 (pyruvate dehydrogenase 1, PDK1)是糖酵解限速酶,脂肪组织缺氧时细胞代谢向无氧糖酵解转化,PDK1

表达升高^[24]。葡萄糖转运子 1 (glucose transporter 1, GLUT1)是巨噬细胞葡萄糖转运子亚型,在促进巨噬细胞激活和炎症反应中发挥重要作用^[25]。本研究结果发现在乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中沉默 EFHD2 的表达会下调糖降解相关 GLUT1、

PDK1、PFK1、PKM2 和促乳酸生成的 LDH 及乳酸的水平,并上调促进丙酮酸脱羧的 PDH 及能量来源 ATP 的水平,揭示沉默 EFHD2 可促进能量代谢及糖代谢,降低乳酸生成并促进丙酮酸降解。

EFHD2 是一种具有两个 EF 手形蛋白结构域的钙结合蛋白^[26]。体内研究表明,EFHD2 可能与多种肿瘤的免疫浸润和肿瘤耐药相关。例如,一项早期的研究报道,EFHD2 通过增加 Rho 家族的 GTP 酶信号传导来刺激癌症的侵袭和转移^[27]。最近的一项研究表明,它可能参与非小细胞肺癌的耐药和上皮-间充质转化^[11],并通过细胞骨架重塑影响巨噬细胞的迁移^[28]。目前,EFHD2 在癌细胞侵袭和转移方面的重要作用引起了科研学者的关注。研究发现 EFHD2 在肺腺癌中高表达,可促进肺腺癌细胞迁移、侵袭,也能促进 EMT,且其表达与肺腺癌患者术后复发显著相关,是患者预后的独立预测因子^[29]。EFHD2 高表达与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者化疗后的低总生存率相关,EFHD2 过表达增加了顺铂耐药,而 EFHD2 沉默增加了细胞对顺铂的敏感性,其机制与 EFHD2 诱导 NOX4 产生,增加细胞内 ROS 生成,促进药物外排有关^[11]。然而,迄今为止,EFHD2 在乳腺癌中的表达及对乳腺癌发生发展的影响尚未见文献报道。本研究结果表明沉默 EFHD2 可减少乳腺癌细胞的集落生成及细胞侵袭数,缩短细胞迁移距离,并使细胞凋亡增多,揭示 EFHD2 在乳腺癌中可通过抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、迁移及侵袭从而加重癌的发生和进展。

与正常细胞相比,癌细胞由于原癌基因激活、代谢异常和线粒体功能紊乱等原因,需要更高浓度的抗氧化酶和 GSH 来控制活性氧(reactive oxygen species, ROS),以此逃逸凋亡来维持其恶性表型^[30]。线粒体是 ROS 和 ATP 产生的主要场所,当线粒体 DNA 发生突变,线粒体呼吸链合成 ATP 效率降低,ROS 含量升高,导致生物大分子(脂质、蛋白质和 DNA)氧化损伤,增加遗传不稳定性,诱发恶性肿瘤^[31-32]。因此,干预癌细胞代谢重编程和线粒体 ROS 产生过程是干预肿瘤细胞免疫逃逸的新思路。NOX4 是 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)家族成员,是线粒体内的一种新型能量传感器,可作为一个检查点,与线粒体能量代谢及癌细胞的耐药性有关^[33]。有研究发现 NOX4 通过激活 ROS/PI3K 信号通路,刺激细胞产生多种因子,诱导

了肿瘤相关巨噬细胞 M2 极化,从而促进 NSCLC 的转移。另外,NOX4 还可诱导 ROS 产生降低肺鳞癌细胞对顺铂的敏感性^[34]。NOX4 过表达可诱导 ROS 生成,促进胶质母细胞的代谢重编程和 EMT 进程^[35]。因此,NOX4/ROS 通路是肿瘤细胞能量代谢重编程和转移的重要机制。本研究结果发现沉默 EFHD2 可下调 NOX4 的表达,并抑制 ROS 生成,揭示沉默 EFHD2 后 NOX4/ROS 通路被抑制。

综上所述,沉默 EFHD2 可通过促进能量代谢,减少葡萄糖及乳酸堆积从而促进乳腺癌细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移及侵袭,其机制与抑制 NOX4/ROS 信号通路活化相关。

参考文献:

- [1] 刘璐,赵燕乔,王晓娜,等. MiR-185-5p 影响小鼠乳腺癌 PY8119 细胞增殖、侵袭迁移的研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1126-1132.
LIU L, ZHAO Y Q, WANG X N, et al. Effect of miR-185-5p on proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer PY8119 cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1126-1132.
- [2] ZHANG L, CHEN W, LIU S, et al. Targeting breast cancer stem cells [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(2): 552-570.
- [3] ZANNETTI A. Breast cancer: from pathophysiology to novel therapeutic approaches 2.0 [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2542.
- [4] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment; a review [J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300.
- [5] RIGGIO A I, VARLEY K E, WELM A L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer [J]. Br J Cancer, 2021, 124(1): 13-26.
- [6] WANG R, ZHU Y, LIU X, et al. The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1091.
- [7] JIANG J, JIANG S, AHUMADA-CANALE A, et al. Breast cancer screening should embrace precision medicine: evidence by reviewing economic evaluations in China [J]. Adv Ther, 2023, 40(4): 1393-1417.
- [8] LEE J. Current treatment landscape for early triple-negative breast cancer (TNBC) [J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1524.
- [9] DONAHUE P M C, MACKENZIE A, FILIPOVIC A, et al. Advances in the prevention and treatment of breast cancer-related lymphedema [J]. Breast Cancer Res Treat, 2023, 200(1): 1-14.
- [10] ZHANG W Z, CHEN L L, YANG S, et al. Clinical characterization of EFHD2 (swiprosin-1) in Glioma-associated macrophages and its role in regulation of immunosuppression [J]. Genomics, 2023, 115(5): 110702.
- [11] FAN C C, TSAI S T, LIN C Y, et al. EFHD2 contributes to

- non-small cell lung cancer cisplatin resistance by the activation of NOX4-ROS-ABCC1 axis [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101571.
- [12] KANG Y, AMOARO E B, ENTSIE P, et al. A role for platelets in metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1250982.
 - [13] 郭思佳, 周中源. 有氧运动抑制 Nox4/ROS/NF- κ B/NLRP3 炎症信号通路减轻糖尿病 db/db 小鼠肾脏损伤的作用机制研究 [A]. 2023 年中国生理学会运动生理学专业委员会学术会议暨运动生理学专业委员会成立 20 周年庆祝大会论文集、南京医科大学康达学院; 连云港市妇幼保健 [C]. 2023.
 - GUO S, ZHOU Z Y. Study on the mechanism of aerobic exercise inhibiting the activation of Nox4/ROS/NF- κ B/NLRP3 inflammatory signaling pathway to reduce renal injury in diabetic db/db mice [A]. *Proceedings of the 2023 Academic Conference of the Exercise Physiology Professional Committee of the Chinese Physiological Society and the 20th Anniversary Celebration of the Establishment of the Exercise Physiology Professional Committee, Kangda College of Nanjing Medical University; Maternal and Child Health Care in Lianyungang* [C]. 2023.
 - [14] SU X, YANG Y, YANG Q, et al. NOX4-derived ROS-induced overexpression of FOXM1 regulates aerobic glycolysis in glioblastoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1181.
 - [15] ZENG C, WU Q, WANG J, et al. NOX4 supports glycolysis and promotes glutamine metabolism in non-small cell lung cancer cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101: 236–248.
 - [16] 崔玮, 崔迪, 欧阳婷, 等. 抑制 NOX 缓解酒精肝模型小鼠肝细胞损伤及脂代谢紊乱 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(35): 5589–5595.
 - CUI W, CUI D, OUYANG T, et al. Inhibiting NADPH oxidase alleviates hepatocellular injury and lipid metabolism disorder in a mouse model of alcoholic liver damage [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(35): 5589–5595.
 - [17] LIU X, SONG J, ZHANG H, et al. Immune checkpoint HLA-E: CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(2): 272–287.
 - [18] GONZALEZ H, HAGERLING C, WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(19/20): 1267–1284.
 - [19] TSAI C H, CHUANG Y M, LI X, et al. Immunoediting instructs tumor metabolic reprogramming to support immune evasion [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(1): 118–133.
 - [20] YANG K, WANG X, SONG C, et al. The role of lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment [J]. *Theranostics*, 2023, 13(6): 1774–1808.
 - [21] CHELAKKOT C, CHELAKKOT V S, SHIN Y, et al. Modulating glycolysis to improve cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2606.
 - [22] WU H, HUANG H, ZHAO Y. Interplay between metabolic reprogramming and post-translational modifications: from glycolysis to lactylation [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1211221.
 - [23] LI G, CHOI J E, KRYCZEK I, et al. Intersection of immune and oncometabolic pathways drives cancer hyperprogression during immunotherapy [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(2): 304–322.
 - [24] MA Y, ZHANG X, HAN X, et al. PDK1 regulates the progression of esophageal squamous cell carcinoma through metabolic reprogramming [J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(6): 866–881.
 - [25] WANG P, SUN J, SUN C, et al. BTF3 promotes proliferation and glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating GLUT1 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2023, 24(1): 2225884.
 - [26] VUADENS F, RUFER N, KRESS A, et al. Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes [J]. *Proteomics*, 2004, 4(8): 2216–2220.
 - [27] HUH Y H, OH S, YEO Y R, et al. Swiprosin-1 stimulates cancer invasion and metastasis by increasing the Rho family of GTPase signaling [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 13060–13071.
 - [28] TU Y, ZHANG L, TONG L, et al. EFhd2/swiprosin-1 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 263–271.
 - [29] FAN C C, CHENG W C, HUANG Y C, et al. EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14617.
 - [30] WANG R, LIANG L, MATSUMOTO M, et al. Reactive oxygen species and NRF2 signaling, friends or foes in cancer? [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 353.
 - [31] LIU Y E, SUN Y, GUO Y, et al. An overview: the diversified role of mitochondria in cancer metabolism [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(3): 897–915.
 - [32] LIU Y E, CHEN C, WANG X, et al. An epigenetic role of mitochondria in cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(16): 2518.
 - [33] PEÑUELAS-HARO I, ESPINOSA-SOTELO R, CROSAS-MOLIST E, et al. The NADPH oxidase NOX4 regulates redox and metabolic homeostasis preventing HCC progression [J]. *Hepatology*, 2023, 78(2): 416–433.
 - [34] 张伟楠. 咪康唑通过抑制 PI3K/Akt/NOX4 通路诱导肺鳞癌细胞凋亡并增敏顺铂的机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
 - ZHANG W N. Mechanism of miconazole inducing apoptosis and sensitizing cisplatin in lung squamous carcinoma cells by inhibiting PI3K/Akt/NOX4 pathway [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.
 - [35] SU X, YANG Y, GUO C, et al. NOX4-derived ROS mediates TGF- β 1-induced metabolic reprogramming during epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT/HIF-1 α pathway in glioblastoma [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5549047.