

创新团队成果专栏

MUC1 在 HER2 阳性乳腺癌发病中的作用及机制研究

王成志, 邓华云, 庞 智, 黄 雷

上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025

[摘要] **目的**·研究黏蛋白 1 (mucin 1, MUC1) 在人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性乳腺癌发病中的作用及其调控的分子机制。**方法**·使用病毒感染技术构建 MT2/MUC1 诱导表达细胞株和 MT2/Vec 及 MT2/CD 过表达细胞株; 采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测过表达 MUC1 和 MUC1-CD 后 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, G6PD) 的蛋白质表达水平; 通过细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法、平板克隆形成实验、细胞划痕实验、Transwell 迁移实验和肿瘤细胞成球实验, 研究 MUC1 对 HER2 阳性乳腺癌细胞 MT2 增殖、克隆形成、迁移和成球的影响; 使用 G6PD 的抑制剂 6-AN 抑制酶活性, CCK-8 检测乳腺癌细胞增殖; 采用 GEPIA 和 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 HER2、MUC1 和 G6PD 在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌患者生存期的影响。**结果**·过表达 MUC1 或 MUC1-CD 促进 HER2 阳性乳腺癌细胞 MT2 的增殖、克隆形成、迁移和成球, 并且提高 G6PD 的蛋白质表达水平。抑制 G6PD 活性显著降低 MUC1 和 MUC1-CD 诱导的细胞增殖。G6PD 蛋白在乳腺癌组织中表达上调且与乳腺癌患者生存期缩短相关。**结论**·MUC1 可能通过调控 G6PD 的表达促进 HER2 阳性乳腺癌的进程, 提示抑制磷酸戊糖途径可能成为 HER2 阳性乳腺癌治疗的靶点。

[关键词] 乳腺癌; 黏蛋白 1; 磷酸戊糖途径; 6-磷酸葡萄糖脱氢酶

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.07.001 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A

Mechanism of MUC1 in the pathogenesis of HER2-positive breast cancer

WANG Cheng-zhi, DENG Hua-yun, PANG Zhi, HUANG Lei

Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To study the role and mechanism of mucin 1 (MUC1) in the pathogenesis of HER2-positive breast cancer. **Methods**·Virus infection technology was employed to construct MT2/MUC1 and MT2/Vec/MUC1-CD overexpression cell lines; Western blotting was used to detect the expression level of relative proteins; the ability of cell proliferation, migration and sphere formation were detected by using cell counting kit-8 (CCK-8), colony formation, wound healing, transwell and sphere formation experiments respectively; inhibitor 6-AN was used to inhibit glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD) activity, and the proliferation of breast cancer cells was detected by CCK-8. GEPIA and Kaplan-Meier Plotter database were analyzed to figure out the relationship of HER2, MUC1 and G6PD expression with the survival of breast cancer patients. **Results**·Overexpression of MUC1 or MUC1-CD promoted the proliferation, clone formation, migration and sphere formation of MT2 HER2-positive breast cancer cells, as well as elevating the protein level of G6PD. Inhibition of G6PD activity significantly reduced cell proliferation induced by MUC1 and MUC1-CD. High level of G6PD protein in breast cancer tissues is associated with significantly lower survival of breast cancer patients. **Conclusion**·MUC1 may promote the progression of HER2-positive breast cancer by up-regulating the expression of G6PD, suggesting that inhibition of the pentose phosphate pathway may be a target for the treatment of HER2-positive breast cancer.

[Key words] breast cancer; mucin 1 (MUC1); pentose phosphate pathway (PPP); glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD)

我国乳腺癌的发病率和死亡率分别位居女性恶性肿瘤的第一位和第五位^[1]。在临床上根据雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2 或 ERBB2) 的表达情况, 乳腺癌分为 4 种不同亚型: Luminal A 型 (ER

或/和 PR 阳性, HER2 阴性)、Luminal B 型 (ER 或/和 PR 阳性, HER2 阳性)、HER2 过表达型 (ER 和 PR 阴性, HER2 阳性) 以及三阴性 (ER、PR 和 HER2 均为阴性)^[2]。其中 HER2 过表达型占乳腺癌的 20%~30%, 是由 HER2 基因扩增等机制而导致 HER2 受体过表达。由于 HER2 可与其家族成员其他激酶受体 HER1 (EGFR)、

[基金项目] 国家自然科学基金 (82073111, 81874197); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZLCX20180102)。

[作者简介] 王成志 (1994—), 男, 硕士; 电子信箱: 1805490350@qq.com。

[通信作者] 黄 雷, 电子信箱: huanglei@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Nature Science Foundation of China (82073111, 81874197); Innovative Research Team of High-level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZLCX20180102).

[Corresponding Author] HUANG Lei, E-mail: huanglei@shsmu.edu.cn.

[网络首发] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210630.0953.002.html> (2021-06-30 14:30:11)。



HER3或HER4形成异源二聚体,激活下游信号通路,使细胞获得快速增殖和侵袭能力,因此HER2过表达型乳腺癌患者具有不良的预后^[3]。

靶向HER2的单抗药物和小分子抑制剂已广泛应用于HER2阳性转移性乳腺癌的临床治疗,可显著改善HER2阳性乳腺癌患者的预后^[4-5]。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗和帕妥珠单抗可结合于HER2细胞外结构域II,阻止其形成同源和异源二聚体,其中包括HER2/HER3异源二聚体^[6-7],从而阻断HER2信号转导。拉帕替尼是一种口服酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI),通过可逆性地抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和HER2激酶活性,而用于治疗晚期HER2阳性乳腺癌^[8]。尽管如此,仍有约70%的HER2阳性乳腺癌患者对上述治疗出现耐药性^[9]。因此,筛选新的生物靶标将为HER2阳性乳腺癌的临床治疗提供指导意义。

黏蛋白1(mucin 1, MUC1)属黏蛋白家族成员,是一种I型单次跨膜糖蛋白,主要表达于大多数分泌型上皮细胞的管腔面,呈极性分布。MUC1与上皮细胞分泌产生的其他黏蛋白一起形成生理屏障,保护细胞免受外界损伤、有毒化合物和微生物的侵袭等^[10]。MUC1在肿瘤中高表达且失去极性,MUC1的胞外段(又称CA153)在临床上已经作为乳腺癌和胰腺癌的诊断指标,也可作为肿瘤免疫治疗的靶标^[11-12]。MUC1的胞内结构域(cytoplasmic domain, CD)高度保守,且含有7个酪氨酸位点,参与生长因子受体和细胞内激酶等信号转导^[13]。同时,MUC1可与STAT3、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、p53和 β -连环蛋白(β -catenin)等多种转录因子结合,参与靶基因的表达调控^[14-15]。由于基因拷贝数的增加和异常的转录调控,MUC1在超过90%的乳腺癌中高表达。MUC1-C端可参与STAT1/3和NF- κ B等信号并正反馈促进MUC1在乳腺癌中的表达^[16]。

多项研究^[17-18]证明,MUC1与HER2存在相互作用并与单抗药物治疗耐药密切相关。但MUC1在HER2阳性乳腺癌发病中的作用未见报道。本研究旨在通过对MUC1在HER2阳性乳腺癌发病中的作用进行研究,揭示MUC1是否促进HER2阳性乳腺癌细胞恶性特征,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 PCR仪、核酸凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国), LAS-4000 mini化学发光成像系统(通用, 日本),

超净工作台、细胞培养箱(Thermo, 美国)。

1.1.2 试剂 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒(MN, 德国), Lipo 2000转染试剂(Thermo, 美国), DMEM、DMEM/F-12基础培养基(Hyclone, 美国), F-12液体培养基(上海源培生物科技股份有限公司), 胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)(Gibco, 美国), 胰蛋白酶(苏州新赛美生物科技有限公司), 胰岛素、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Peprotech, 美国)、BSA(Sigma, 美国), 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)(同仁, 日本), β -actin抗体(CST, 美国)。

1.1.3 细胞 小鼠HER2阳性永生型乳腺癌上皮细胞MT2由上海交通大学医学院生物化学与分子生物学系吴学峰老师馈赠。MT2细胞中转入诱导表达的质粒pInducer-MUC1, 记为MT2 pInducer-MUC1(MT2/MUC1); MT2细胞中分别转入Vector和MUC1-CD, 记为MT2/Vec和MT2/CD。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 ①MT2细胞培养基制备:取胰岛素(10 mg/mL) 25 μ L, 氢化可的松(1 mg/mL) 50 μ L, EGF(100 μ g/mL) 5 μ L, 庆大霉素(100 mg/mL) 25 μ L, FBS 7.5 mL, F-12培养基补至50 mL。②成球培养基制备:取8% BSA 2.5 mL, bFGF 10 μ L, EGF(100 μ g/mL) 10 μ L, 胰岛素(25 mg/mL) 100 μ L, B27 1 mL, DMEM/F12培养基补至50 mL, 0.22 μ m滤头过滤后4 $^{\circ}$ C保存。细胞培养在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的培养箱中。

1.2.2 稳转细胞株构建 ①质粒构建。将MUC1-HA基因酶切并连接至pENTRTM1A质粒中, 构建pENTRTM1A-MUC1-HA质粒; pENTRTM1A-MUC1-HA与pInducer-20进行重组反应, 构建pInducer-MUC1-HA质粒。经酶切、测序鉴定后, 将质粒转染293T细胞, 并加入多西环素(doxycycline, DOX)诱导表达, 采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白质表达。②病毒包装。将293T细胞铺至10 cm培养皿中, 密度以第2日达30%~40%为宜。在1.5 mL EP管中, 按密度 $\rho=0.4$ g/L(质粒:转染试剂)取Lipo 2000 20 μ L加至250 μ L opti-MEM中。同时, 在另一个1.5 mL EP管中, 将pMD2.G质粒1 μ g、psPAX2质粒3 μ g、目的质粒4 μ g加至250 μ L opti-MEM中, 室温静置5 min。两管混合均匀, 室温静置20 min后逐滴滴加至培养皿中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养, 4~6 h后换液。培养48 h后, 用20 mL注射器吸取病毒上清液

经0.45 μm滤头过滤,分装病毒并保存于-80℃。③病毒感染。MT2细胞接种至6 cm培养皿中,密度以第2日达30%~40%为宜。配制病毒感染体系:取4 mL无双抗的完全培养基、1 mL病毒液和4 μL polybrene(终浓度8 μg/mL),弃原培养基,加入配制好的病毒液至培养皿中,感染4~6 h后换液,37℃、5% CO₂培养箱培养。待细胞长满后按一定比例传代,并加入抗性筛选药物G418(终浓度0.8 μg/mL),筛选1周后收集混合克隆细胞检测蛋白表达。

1.2.3 Western blotting 将收集的细胞样品加入NETN150裂解液,用考马斯蓝染色法将蛋白定量;取20 μg总蛋白量上样至SDS-PAGE胶进行电泳;电泳结束后,转移SDS-PAGE胶至NC膜或PVDF膜上;转膜结束后,5%脱脂牛奶室温封闭1 h;加入一抗(2% BSA配制),4℃孵育7~9 h或过夜;加入5%牛奶配制的二抗,室温孵育;化学发光成像系统进行显色反应。

1.2.4 细胞计数试剂盒8法检测细胞增殖 细胞接种至96孔板中,设置3复孔,37℃、5% CO₂培养;待细胞完全贴壁后,在第0日的孔中加入CCK-8试剂,37℃反应2 h,酶标仪检测吸光度;绘制不同时间细胞的生长曲线。

1.2.5 平板克隆形成实验 细胞接种至6孔板,设置3个复孔,37℃、5% CO₂培养10 d;形成肉眼可见的克隆时,终止培养,弃培养液,加入甲醇固定;弃甲醇,加入结晶紫染色,自来水缓慢冲洗去除残留结晶紫,室温晾干;扫描仪扫描成像,计数克隆数,并根据以下公式计算克隆形成率:克隆形成率=克隆数/细胞数×100%。

1.2.6 划痕实验 细胞消化计数后,按2.5×10⁵/孔的密度接种至12孔板中,以第2日细胞密度达到100%为宜;待细胞密度达到100%后,用干净的中枪头沿着直尺在12孔板的孔中央划一道痕;弃去培养基,PBS洗涤3次去除漂浮的细胞,加入无血清培养基,10倍显微镜下拍照(T0);37℃、5% CO₂培养24 h后,10倍显微镜下拍照(T1)。采用Image J软件计算划痕平均距离。根据以下公式计算细胞迁移率:细胞迁移率=(宽度_{T0}-宽度_{T1})/宽度_{T0}×100%。

1.2.7 Transwell 迁移实验 用无血清培养基重悬细胞,并加至上室中,37℃、5% CO₂培养24 h;吸去小室中残留培养基,转移至甲醇中固定;吸去残留甲醇,转移至结晶紫中染色过夜;用自来水洗去残留染色液,并用棉签擦去上室中未迁移的细胞,室温晾干;10倍镜下选取不同视野拍照,计数迁移的细胞数目,并做统计分析。

1.2.8 肿瘤细胞成球实验 用不含FBS的DMEM/F12培养基重悬细胞,梯度稀释后细胞接种至低吸附的24孔板中,设置3个复孔,37℃、5% CO₂培养4~7 d;4倍镜下拍照。以≥50 μm为1个球,统计每个孔中球的个数,并

做统计分析。

1.2.9 GEPIA 数据库基因表达相关性分析 采用GEPIA数据库分析MUC1和HER2的表达水平。使用GEPIA数据库网站(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) Expression Analysis功能项中的Expression DIY(Box Blot)或Correlation Analysis功能模块,以BRCA(乳腺癌)作为癌症种类,对MUC1和HER2进行相关性分析。采用TCGA数据库分析6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, G6PD)的表达水平。对于乳腺癌(BRCA),选择基于1 097例Tumor以及113例Normal样本的RNA-seq counts数据,采用GDC工具下载RNA-seq counts文件。使用DESeq2中的估计色散方法(estimate the dispersion)对数据进行标准化。G6PD基因在癌(1 097例)与癌旁(113例)组织样本的表达差异通过箱式图来表示。纵轴为各个样本表达量的原始数据,横轴为样本类型分类(normal和tumor),每个点代表一个样本。

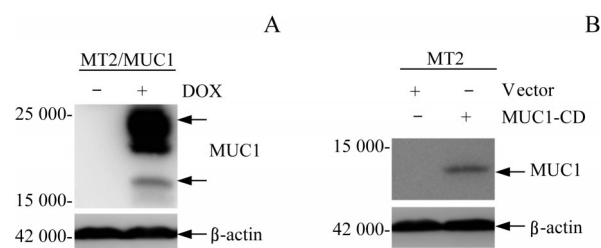
1.3 统计学分析

实验数据采用GraphPad Prism 6和Adobe Illustrator CS4软件作图,统计分析采用SPSS 20软件。定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MUC1过表达细胞株构建

为了探究MUC1对HER2阳性乳腺癌细胞特性的影响,首先利用MUC1全长或MUC1-CD病毒表达载体感染Her2转基因小鼠的乳腺癌原代细胞MT2,构建MUC1全长诱导表达和MUC1-CD过表达的细胞株。Western blotting结果检测显示,与对照组相比,MUC1诱导表达组(DOX+)中MUC1表达水平明显上调(图1A);MUC1-CD过表达组中也检测到MUC1的表达(图1B)。



Note: A. The MT2/MUC1 cells were treated with DOX (1 μg·mL⁻¹) for 48 h, and then collected for Western blotting to detect MUC1 expression. B. The expression of MUC1 was detected by Western blotting in MT2/CD cells.

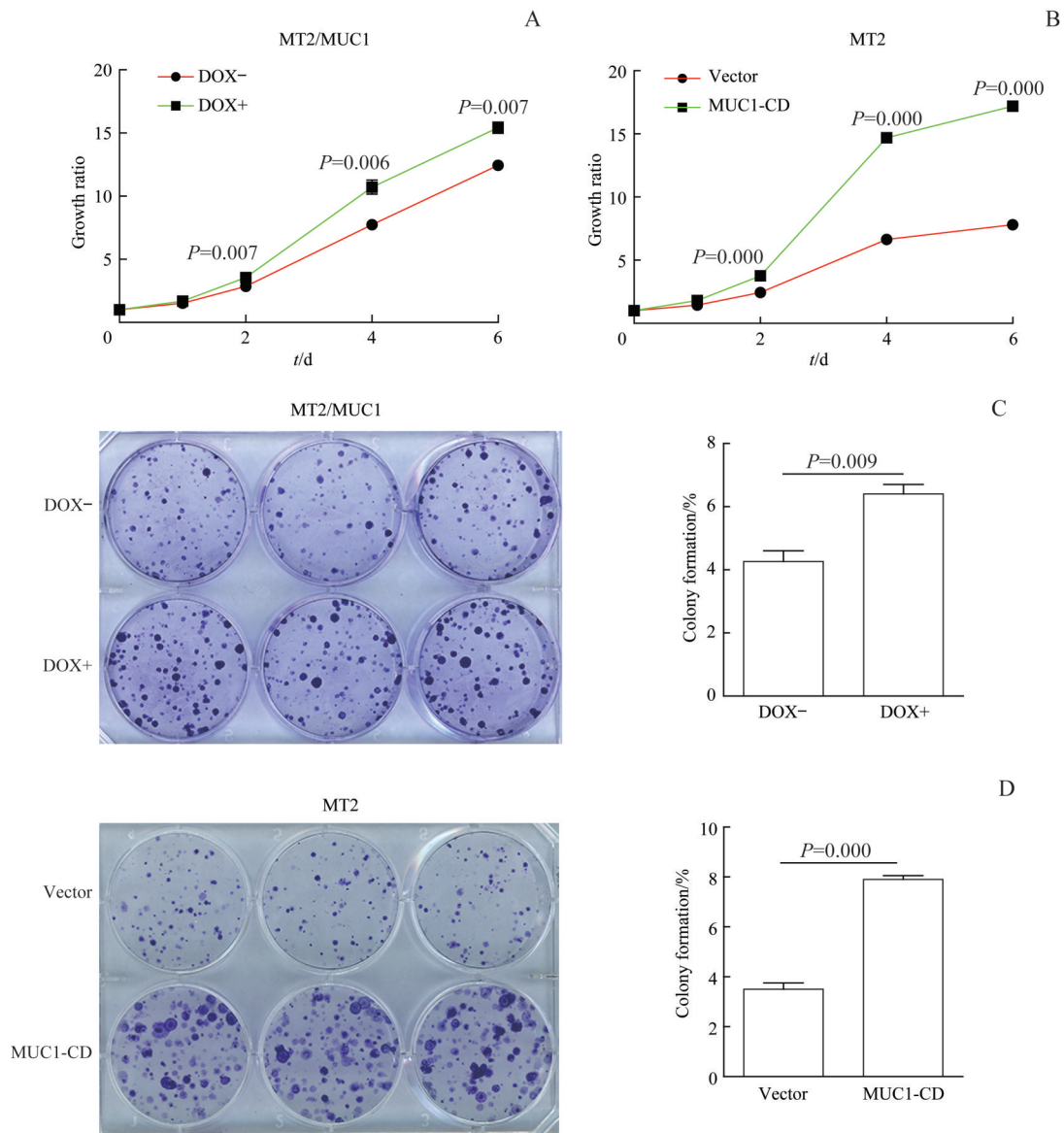
图1 Western blotting检测MUC1的表达

Fig 1 Expression of MUC1 was detected by Western blotting

2.2 MUC1 促进乳腺癌细胞增殖和克隆形成

为了检测 MUC1 过表达对 MT2 乳腺癌细胞增殖的影响, 首先通过 CCK-8 对细胞的增殖能力进行了检测。结果显示, MUC1 诱导表达组 (DOX+) 细胞的生长速度与对照组 (DOX-) 相比明显增加, 且差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2A)。与 MUC1 诱导表达组 (DOX+) 细胞相同, MUC1-CD 过表达组细胞也表现出明显增殖优

势, 且差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2B)。利用平板克隆形成实验进一步检测 MUC1 的作用, 发现过表达 MUC1 全长 (图 2C) 和 MUC1-CD (图 2D) 后, 细胞形成克隆数目明显增多, 且差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。这些结果说明, MUC1 过表达具有促进乳腺癌细胞增殖和克隆形成的能力。



Note: A/B. 5 000 cells were incubated per well, and the proliferation ability was detected by CCK-8 for MT2/MUC1 cells (A) and MT2/CD cells (B). C/D. 1 000 cells were incubated per well and cultured for 10 d, and colony formation experiment was performed with MT2/MUC1 cells (C) and MT2/CD cells (D).

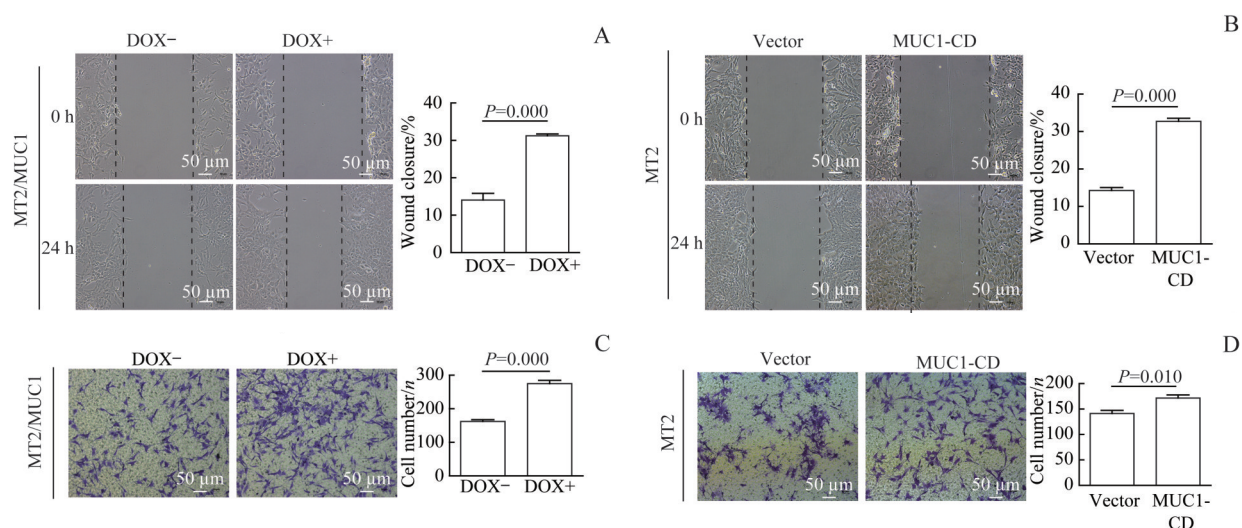
图 2 MUC1 促进乳腺癌细胞增殖和克隆形成能力

Fig 2 MUC1 promotes breast cancer cell proliferation and colony formation ability

2.3 MUC1 促进乳腺癌细胞迁移

为了检测 MUC1 的过表达对乳腺癌细胞的迁移能力的影响, 分别进行了划痕实验和 Transwell 迁移实验。划痕实验结果显示, 与对照组相比, 不论是 MUC1 诱导表达组 (DOX+) 还是 MUC1-CD 过表达组的细胞迁移率均

显著增加 (图 3A、B)。同时, Transwell 迁移实验结果也表明, MUC1 诱导表达组 (DOX+) 和 MUC1-CD 过表达组中细胞的移行能力增强显著 (图 3C、D)。上述结果差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。这些结果说明, MUC1 的过表达可促进乳腺癌细胞的迁移能力。



Note: A/B. Wound healing experiment was performed to detect the migration ability of MT2/MUC1 cells (A) and MT2/CD cells (B). C/D. Transwell was used to detect the migration of MT2/MUC1 cells (C) MT2/CD cells (D).

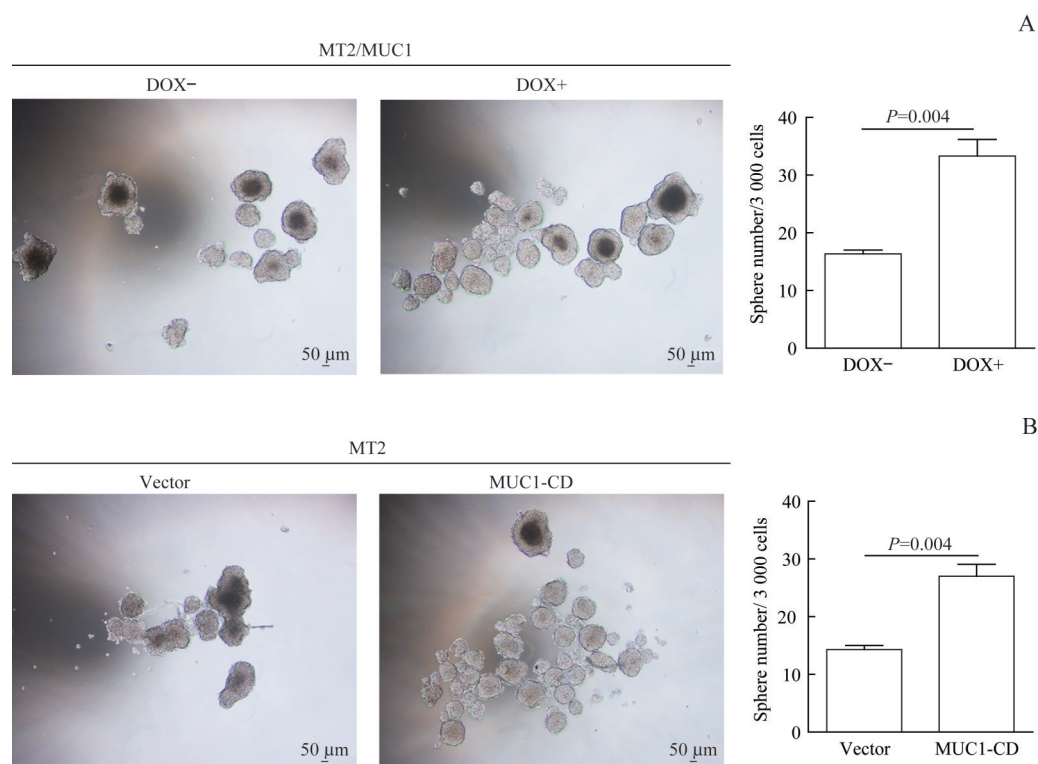
图3 MUC1促进乳腺癌细胞迁移

Fig 3 MUC1 promotes breast cancer cell migration

2.4 MUC1增加乳腺癌细胞成球数目

肿瘤细胞中的干细胞或起始细胞是导致肿瘤增殖和耐药的重要原因之一。通过成球实验检测MUC1的过表达对乳腺癌干细胞的影响。实验结果表明,与对照组相

比,MUC1全长诱导表达组和MUC1-CD过表达组成球数目增多(图4A、B),差异具有统计学意义。提示MUC1促进乳腺癌细胞的成球能力。



Note: A. Sphere formation of MT2/MUC1 cells. B. Sphere formation of MT2/MUC1-CD cells.

图4 MUC1增加乳腺癌细胞的成球能力

Fig 4 MUC1 increases the sphere formation of breast cancer cells

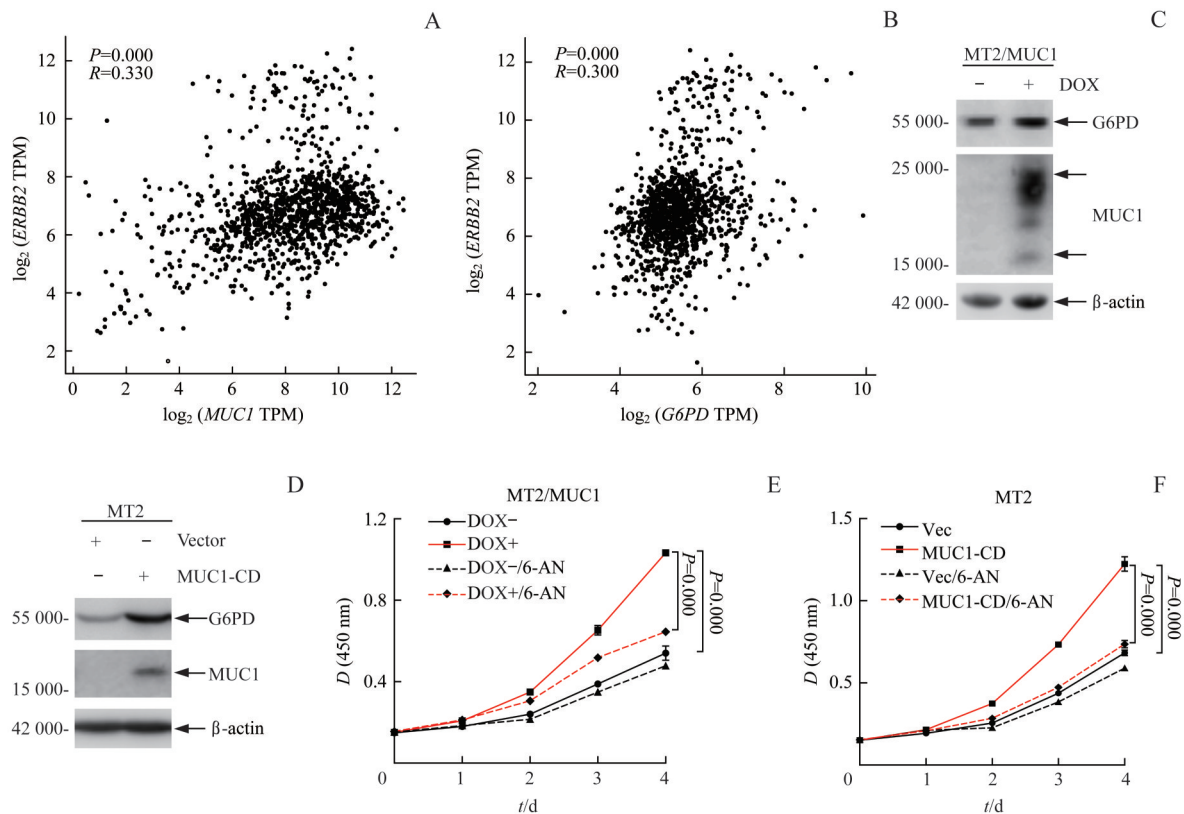
2.5 G6PD参与MUC1诱导的乳腺癌细胞增殖作用

快速增殖是肿瘤细胞共有的特征,磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)在细胞增殖过程中为

其提供DNA合成所需的原料,而G6PD是PPP途径的第一个限速酶。GEPIA数据库的分析表明,MUC1与HER2(ERBB2),HER2(ERBB2)与G6PD在乳腺癌中

具有相关性,但未发现 *MUC1* 和 *G6PD* 在 mRNA 水平的相关性 (图 5A、B)。为了探究 *G6PD* 是否参与 *MUC1* 对 HER2 阳性乳腺癌细胞恶性表型的调控作用,利用 MT2/*MUC1* 和 MT2/*MUC1*-CD 2 个细胞系进行相关研究。Western blotting 结果显示,与对照组相比,MT2/*MUC1* 和 MT2/*MUC1*-CD 细胞中 *G6PD* 的蛋白质表达水平均明显上调 (图 5C、D)。上述结果表明 *MUC1* 过表达可上调 HER2 阳性乳腺癌细胞中 *G6PD* 的蛋白质表达水平。

G6PD 的抑制剂 6-AN,可以抑制细胞内 *G6PD* 的酶活性。为进一步证明 *G6PD* 是否参与 *MUC1* 诱导的乳腺癌细胞恶性特征形成,利用 6-AN 抑制剂处理细胞,并检测乳腺癌细胞的增殖情况。CCK-8 结果显示,在 *MUC1* 诱导过表达组和过表达组中,与对照组相比,加入 6-AN 后均可显著抑制 *MUC1* 全长或 *MUC1*-CD 诱导的细胞增殖 (图 5E、F)。上述结果表明, *G6PD* 蛋白参与 *MUC1* 诱导的乳腺癌细胞增殖作用。



Note: A. The correlation between *HER2* (*ERBB2*) and *MUC1* in breast cancer was analyzed through GEPIA database. B. The correlation between *HER2* (*ERBB2*) and *G6PD* in breast cancer was analyzed by searching GEPIA database. C. The expression of *G6PD* was detected in MT2/*MUC1* cells with DOX ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) induction for 48 h. D. The expression of *G6PD* was detected in MT2/*CD* cells. E/F. 5 000 cells were incubated per well and treated with or without 6-AN ($50 \mu\text{mol}$), and the cell proliferation was detected by CCK-8 in MT2/*MUC1* cells (E) and MT2/*CD* cells (F).

图5 *G6PD* 参与 *MUC1* 诱导的乳腺癌细胞增殖作用

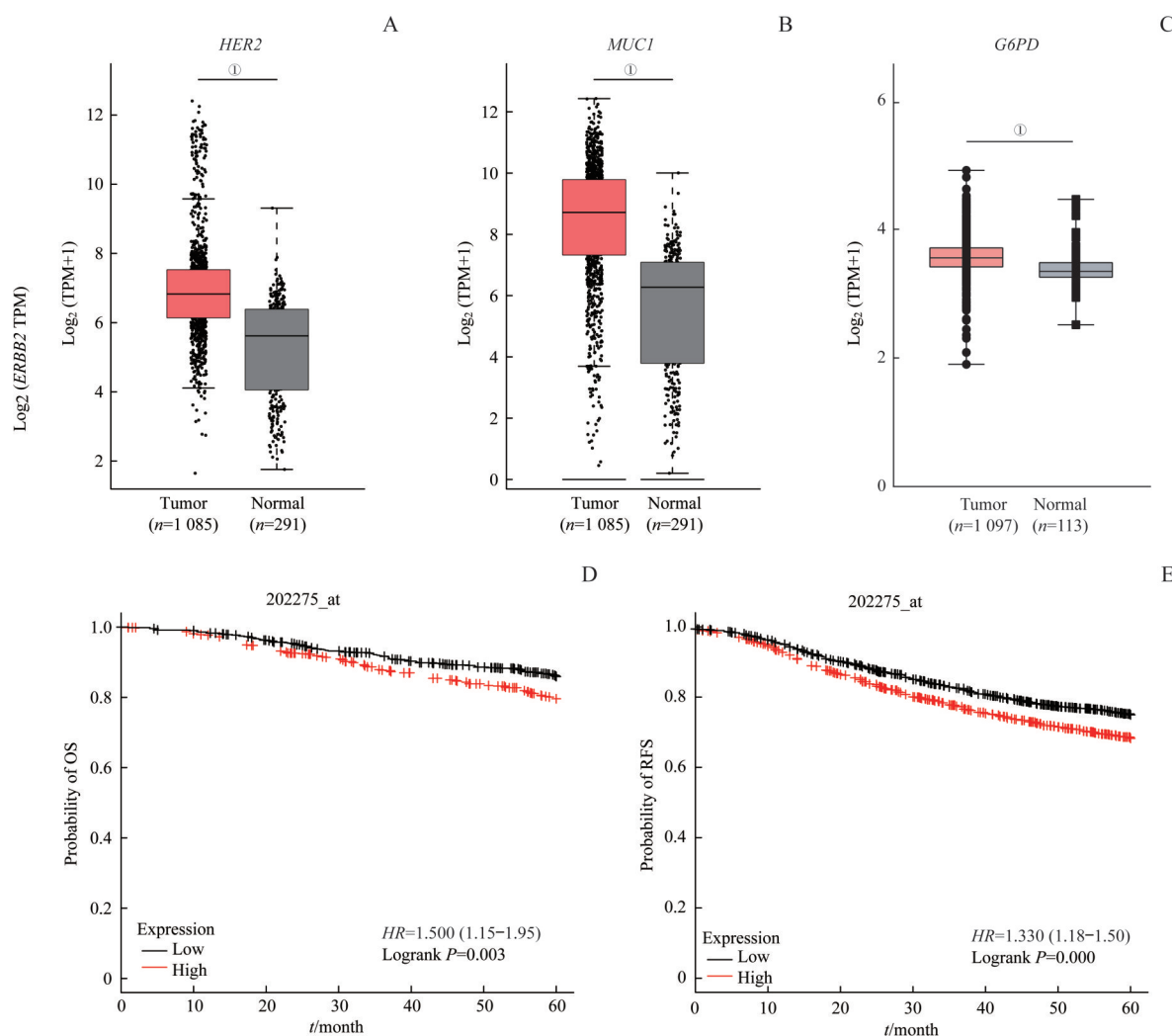
Fig 5 *G6PD* is involved in the proliferation of breast cancer cells induced by *MUC1*

2.6 *G6PD* 在乳腺癌中高表达且与患者生存期呈负相关

为了深入分析 *G6PD* 在乳腺癌样本中的表达情况,分别在 GEPIA 和 TCGA 数据库中对 *HER2*、*MUC1* 和 *G6PD* 的表达水平进行分析。结果显示, *HER2*、*MUC1* 和 *G6PD* 在乳腺癌中均呈高表达 (图 6A~C)。同时,通过 Kaplan-Meier 法对 *G6PD* 高表达的乳腺癌的 5 年生存期分析发现, *G6PD* 高表达患者总生存期 (overall survival, OS) 和无复发生存期 (relapse-free survival, RFS) 均下降 (图 6D、E), 差异有统计学意义。数据库分析表明, *G6PD* 在乳腺癌中高表达且与不良预后密切相关。

3 讨论

研究表明, *MUC1* 可通过胞内段与其他癌基因编码的蛋白, 如 β -catenin、EGFR 以及 C 末端 Src 激酶 (C-terminal Src kinase, Csk, 又称 c-Src) 等相互作用, 参与细胞内信号转导^[19-20]。研究^[17] 证明, *MUC1* 与 *HER2* 存在相互作用, 并且在 *HER2* 单抗药物治疗耐药细胞株中相互作用加强。*MUC1* 过表达可以促进 *HER2* 阳性乳腺癌对他莫昔芬的治疗抵抗; 相反, *MUC1* 的敲减可显著阻断耐药株中 *HER2* 下游信号的激活, 并可缓解 *HER2* 靶向治



Note: A/B. *HER2* (A) and *MUC1* (B) expression levels were analyzed in GEPIA database. C. *G6PD* expression level were analyzed in TCGA database. D. 5-year OS of breast cancer was analyzed in Kaplan-Meier plotter with high or low level of *G6PD* expression. E. RFS was analyzed in Kaplan-Meier plotter with high or low level of *G6PD* expression. ^① $P < 0.05$. TPM—transcript per million.

图6 利用数据库分析G6PD表达与生存期的关系

Fig 6 Database analysis of the expression of *G6PD* and survival

疗的耐药情况^[17]。这些结果表明MUC1可与HER2相互作用并参与HER2阳性乳腺癌耐药的过程。但在人乳腺癌细胞中MUC1与HER2之间的研究较多,在小鼠细胞中MUC1与HER2的研究较少。本研究发现过表达MUC1可促进小鼠肿瘤细胞的增殖和迁移能力,进一步研究发现过表达MUC1也促进了小鼠肿瘤细胞克隆形成和成球能力。对MUC1作用的功能域进行研究发现,MUC1-CD即可发挥促进肿瘤恶性特征的作用。

快速增殖能力和异常的能量代谢是肿瘤的两大特征。在肿瘤生长过程中,葡萄糖作为主要的能源物质,除了经糖酵解和三羧酸循环途径生成ATP和CO₂之外,还存在其他代谢途径,如PPP等。G6PD是调控PPP的关键限速酶。PPP生成的NADPH可为细胞的各种合成反应提供还原剂,如参与脂肪酸和固醇类物质的合成。此外,PPP

途径产生的5-磷酸核糖(ribose-5-phosphate, R5P)是细胞内唯一参与核酸生物合成的五碳糖,对于维持细胞内DNA和RNA的水平具有重要作用。G6PD在许多正常代谢组织中高表达,包括肝脏、脂肪组织,以及乳腺和肾上腺^[21],肿瘤细胞中也有高水平的表达。核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)在转移性乳腺癌细胞中过表达,并通过促进G6PD和HIF-1 α 途径上调Notch1的表达,进而促进乳腺癌的增殖转移^[22]。G6PD受细胞外刺激和信号通路的调节,这些通路可以调节其表达并通过翻译后修饰调节G6PD活性。酪氨酸激酶Src可直接磷酸化G6PD并诱导细胞转移^[23]。在某些细胞类型中,cAMP直接或间接下调G6PD活性。cAMP激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA),可以直接磷酸化G6PD的丝/苏氨酸残基并抑制其活性。NADP⁺/NADPH比

率是该酶的主要调节剂之一。NADPH 负调节 G6PD 的活性, 而 NADP^+ 是其酶活性和正确构象所必需的^[24]。抑制 G6PD 可降低 NADPH 的产生, 降低 GSH 的水平, 进而降低清除 ROS 水平的能力, 并通过体外 ROS 介导的损伤增强奥沙利铂诱导的结直肠癌细胞凋亡^[25]。也有研究^[26]发现, 胰腺癌细胞中 MUC1 的过表达通过增强糖酵解、PPP 和核苷酸生物合成降低辐射诱导的细胞毒性和 DNA 损伤作用。GEPIA 数据库分析发现, MUC1 与 HER2 的表达呈正相关, 而 HER2 与 G6PD 的表达也呈正相关, 这提示 MUC1 与 G6PD 之间可能也存在相关性。

本研究发现, 在 MUC1 和 MUC1-CD 过表达的 MT2 细胞中, G6PD 均呈现高表达, 提示 G6PD 可能参与 MUC1 对肿瘤细胞的增殖、迁移和成球能力的调控。为此, 进一步利用 G6PD 抑制剂 6-AN 处理细胞, 并对肿瘤细胞的恶性特征进行观察。结果表明, MUC1 过表达细胞用 6-AN 处理后可显著降低 MUC1 过表达引起的细胞增殖, 提示 G6PD 的上调参与了 MUC1 对肿瘤细胞的增殖、迁移和成瘤能力的促进作用。

为了验证 G6PD 在乳腺癌中的作用, 进一步利用 TCGA 数据库乳腺癌样本进行分析, 结果表明, G6PD 在乳腺癌中呈现高表达, 与本研究发现相一致。

利用 Kaplan-Meier Plotter 数据库对 G6PD 高表达的乳腺癌的 5 年生存期分析的结果也表明, G6PD 高表达患者的总生存期和无复发生存期均下降, 这提示 G6PD 高表达的患者具有不良的预后反应。也有研究^[27]发现, MUC1 过表达与乳腺癌患者的预后降低、恶性程度增加和癌组织分级增加有关。MUC1 和 G6PD 在乳腺癌中均呈现高表达, 说明两者之间可能存在一定的相关性。后续工作还需进一步明确 MUC1 与 G6PD 的调控关系及作用机制。数据库分析未发现两者在 mRNA 水平的相关性, 接下来需要通过 qPCR 作进一步验证。同时, MUC1 是否会在蛋白质表达水平对 G6PD 的稳定性进行调控仍需要深入研究。

总之, 本研究发现了 MUC1 过表达促进小鼠 HER2 阳性乳腺癌的恶性特征, 初步机制研究表明 MUC1 可能通过调控 G6PD 的表达而发挥促肿瘤作用, 提示抑制 PPP 可能成为 MUC1 相关的 HER2 阳性乳腺癌治疗的靶点。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134-1150.
- [3] Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy[J]. *Chemother Res Pract*, 2012, 2012: 743193.
- [4] Parnas S, Tolane SM. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 1758835919833519.
- [5] Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer[J]. *Lancet*, 2017, 389(10087): 2415-2429.
- [6] von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, et al. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(2): 122-131.
- [7] Nemeth BT, Varga ZV, Wu WJ, et al. Trastuzumab cardiotoxicity: from clinical trials to experimental studies[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(21): 3727-3748.
- [8] Nishimura R, Toh U, Tanaka M, et al. Role of HER2-related biomarkers (HER2, p95HER2, HER3, PTEN, and PIK3CA) in the efficacy of lapatinib plus capecitabine in HER2-positive advanced breast cancer refractory to trastuzumab[J]. *Oncology*, 2017, 93(1): 51-61.
- [9] Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 62.
- [10] McAuley JL, Linden SK, Png CW, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2313-2324.
- [11] Li X, Xu Y, Zhang L. Serum CA153 as biomarker for cancer and noncancer diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162: 265-276.
- [12] Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Detection of serum tumor markers in the diagnosis and treatment of patients with pancreatic cancer[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(3): 464-468.
- [13] Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6): 332-342.
- [14] Ahmad R, Raina D, Joshi MD, et al. MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor- κ B p65 transcription factor[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17): 7013-7021.
- [15] Ahmad R, Rajabi H, Kosugi M, et al. MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop[J]. *Sci Signal*, 2011, 4(160): ra9.
- [16] Khodarev N, Ahmad R, Rajabi H, et al. Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 920-929.
- [17] Raina D, Uchida Y, Kharbanda A, et al. Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2014, 33(26): 3422-3431.
- [18] Kharbanda A, Rajabi H, Jin C, et al. Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(7): 714-723.
- [19] Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches[J]. *Oncogene*, 2013, 32(9): 1073-1081.
- [20] Ren J, Raina D, Chen W, et al. MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(11): 873-883.
- [21] Park J, Rho HK, Kim KH, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 5146-5157.
- [22] Zhang HS, Zhang ZG, Du GY, et al. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1 α /Notch1 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3451-3463.
- [23] Pan S, World CJ, Kovacs CJ, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase is regulated through c-Src-mediated tyrosine phosphorylation in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 895-901.
- [24] Au SW, Gover S, Lam VM, et al. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP^+ molecule and provides insights into enzyme deficiency[J]. *Structure*, 2000, 8(3): 293-303.
- [25] Ju HQ, Lu YX, Wu QN, et al. Disrupting G6PD-mediated redox homeostasis enhances chemosensitivity in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(45): 6282-6292.
- [26] Gunda V, Soucek J, Abrego J, et al. MUC1-Mediated metabolic alterations regulate response to radiotherapy in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(19): 5881-5891.
- [27] Jing X, Liang H, Hao C, et al. Overexpression of MUC1 predicts poor prognosis in patients with breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2): 801-810.

[收稿日期] 2021-01-27

[本文编辑] 张慧俊





特约创新团队介绍

创新团队名称

线粒体代谢应激反应与肿瘤

团队主要成员

团队负责人介绍

程金科 CHENG Jin-ke

博士,特聘教授,博士生导师

Ph.D, Professor, Doctoral Supervisor

ORCID ID:0000-0002-4344-5363

程金科(研究员/博士) **余健秀**(研究员/博士) **邓刘福**(研究员/博士)

黄雷(教授/博士) **王琦**(研究员/博士) **蔡蓉**(副教授/博士)

马皎(副研究员/博士) **王田实**(副研究员/博士) **赵娴**(副研究员/博士)

屠俊(副研究员/博士) **樊秋菊**(高级实验师/硕士,团队秘书)

程金科 (1964—), 上海交通大学医学院特聘教授, 博士生导师, 现任基础医学院院长, 上海市肿瘤微环境与炎症重点实验室主任。现任上海市生物化学与分子生物学学会理事长, 上海市细胞生物学学会副理事长。主要研究蛋白质SUMO修饰的机制以及与疾病的关系, 包括由SENP介导的去SUMO修饰过程和对细胞信号转导的调控机制, 以及它们在发育与疾病过程中的作用与意义。在 *Cell*、*Mol Cell*、*Nat Cell Biol*、*Nat Commun*、*Mol Cell Biol*、*J Biol Chem*、*Oncogene* 等杂志发表研究论文 60 余篇。担任国家重点研发计划项目首席科学家, 已获得多项国家自然科学基金重点项目和上海市科学技术委员会项目等基金资助。

CHENG Jin-ke (1964—), distinguished professor and doctoral supervisor of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, is currently dean of College of Basic Medical Sciences, director of Shanghai Key Laboratory for Tumor Microenvironment and Inflammation. Currently, he is chairman of Shanghai Society of Biochemistry and Molecular Biology, and vice chairman of Shanghai Society of Cell Biology. His research focuses on the mechanism of SUMOylation and its relationship with diseases, including SENPs-mediated deSUMOylation and the regulation of cell signal transduction, as well as their roles and significance in the courses of development and diseases. He has published more than 60 research papers in journals such as *Cell*, *Mol Cell*, *Nat Cell Biol*, *Nat Commun*, *Mol Cell Biol*, *J Biol Chem* and *Oncogene*. He is chief scientist of the National Key Research and Development Program, and has been supported by several key projects of the National Natural Science Foundation of China and the Shanghai Municipal Science and Technology Commission.



主要研究方向

程金研究员领导的协同创新团队围绕线粒体代谢应激反应与肿瘤，聚焦4个关键科学问题开展研究：①线粒体代谢应激反应在肿瘤发生发展中的作用及分子机制。②线粒体代谢应激反应的调控机制。③线粒体代谢应激反应的标志及检测方法。④线粒体代谢应激反应是否可以作为肿瘤防治的靶标。近3年共发表SCI研究论文32篇，获得国家和上海市课题共16项，资助经费达1922万元。培养毕业硕士研究生6名，博士研究生6名。

Prof. CHENG's group focuses on the mitochondrial metabolic stress response and tumor, focusing on four key scientific issues: ① The role of mitochondrial metabolic stress response in the development of tumor and its molecular mechanism. ② The regulatory mechanism of mitochondrial metabolic stress response. ③ Markers and detection methods of mitochondrial metabolic stress response. ④ Whether mitochondrial metabolic stress response can be used as a target for tumor prevention and treatment. In the past three years, 32 SCI research papers have been published, 16 national and Shanghai projects have been awarded, and the funding has reached 19.22 million yuan. A total of 6 postgraduate students and 6 doctoral students have been trained.

近3年代表性成果

- Huang X, Zuo Y, Wang X, et al. SUMO-specific protease 1 is critical for myeloid-derived suppressor cell development and function[J]. Cancer Res, 2019, 79(15): 3891-3902.
- Wang T, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism[J]. Mol Cell, 2019, 75(4): 823-834.e5.
- Liang Q, Zheng Q, Zuo Y, et al. SENP2 suppresses necdin expression to promote brown adipocyte differentiation[J]. Cell Rep, 2019, 28(8): 2004-2011.e4.
- Wang Y, Tian J, Huang C, et al. P53 suppresses SENP3 phosphorylation to mediate G2 checkpoint[J]. Cell Discov, 2020, 6(1): 21.
- Wu AY, Gu LY, Cang W, et al. Fn14 overcomes cisplatin resistance of high-grade serous ovarian cancer by promoting Mdm2-mediated p53-R248Q ubiquitination and degradation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 176.
- Lv Y, Cang W, Li Q, et al. Erlotinib overcomes paclitaxel-resistant cancer stem cells by blocking the EGFR-CREB/GRβ-IL-6 axis in MUC1-positive cervical cancer[J]. Oncogenesis, 2019, 8(12): 70.
- Li W, Lu L, Lu J, et al. cGAS-STING-mediated DNA sensing maintains CD8⁺ T cell stemness and promotes antitumor T cell therapy[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(549): eaay9013.
- Shangguan X, He J, Ma Z, et al. SUMOylation controls the binding of hexokinase 2 to mitochondria and protects against prostate cancer tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1812.
- Lin R, Zhan M, Yang L, et al. Deoxycholic acid modulates the progression of gallbladder cancer through N⁶-methyladenosine-dependent microRNA maturation[J]. Oncogene, 2020, 39(26): 4983-5000.
- Liu T, Zhang H, Fang J, et al. AGO2 phosphorylation by c-Src kinase promotes tumorigenesis[J]. Neoplasia, 2020, 22(3): 129-141.
- Xu F, Shangguan X, Pan J, et al. HOXD13 suppresses prostate cancer metastasis and BMP4-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting SMAD1[J]. Int J Cancer, 2021, 148(12): 3060-3070.
- Ma Q, Xu Y, Tang L, et al. Astragalus polysaccharide attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing oxidative damage and mitochondrial dysfunction[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2851349.
- Ma J, Liu X, Liu P, et al. Identification of a new p53 responsive element in the promoter region of anillin[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1563-1570.