

# 血管紧张素 II 对乳腺癌细胞迁移的影响

曹令森, 沈 玮, 曹祥荣

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 乳腺癌是女性发病率高且恶性程度高的肿瘤, 肿瘤侵袭转移是导致患者死亡的重要原因, 研究与癌细胞转移相关的因子或指标具有重要意义. 本实验采用血管紧张素 II (Ang II) 处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 可促进肿瘤细胞迁移, 增强到 1.51 倍. Q-PCR 检测结果表明, Ang II 能够明显刺激 MDA-MB-231 细胞中 uPA (2.97 倍) 和 uPAR 的表达. 因此, Ang II 刺激乳腺癌细胞 uPA 和 uPAR 的表达, 可能是 Ang II 促进乳腺癌细胞迁移的原因之一.

**[关键词]** 血管紧张素 II, uPA, 乳腺癌细胞

**[中图分类号]** Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616 (2018) 01-0083-05

## Angiotensin II Promotes the Migration of Breast Cancer Cells

Cao Lingsen, Shen Wei, Cao Xiangrong

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Breast cancer is a high incidence and malignant tumor in women. The invasion and metastasis are the major reasons that leading to the death of patients. It is of great significance to study the factors and biomarkers associated with cancer metastasis. In this study, the migration of breast cancer cells MDA-MB-231 treated with the angiotensin II (Ang II) was enhanced. The Ang II significantly stimulated the expression of uPA (2.97 times) and uPAR in MDA-MB-231 cells by the Q-PCR measurement. Therefore, the Ang II could stimulate the expression of uPA and uPAR in breast cancer cells, which maybe one of the reasons promoting breast cancer cell migration by Ang II.

**Key words:** Ang II, uPA, breast cancer cell

血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素系统中主要的效应肽, 通过受体 (Angiotensin II receptor, AT) 来发挥生物学作用. 已有报道证明, Ang II 能够刺激实体瘤的生长, 包括胃癌<sup>[1]</sup>、乳腺癌<sup>[2]</sup>、卵巢癌<sup>[3]</sup>等. 过表达血管紧张素受体 1 (AT 1) 或用 AT1 拮抗剂处理, 都证明 Ang II-AT1 系统的增强可以诱导上皮细胞间质化转变 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进肿瘤生长和血管生成<sup>[4]</sup>. 用 AT1 拮抗剂处理, 可抑制食道腺癌细胞的增殖和肿瘤的生长<sup>[5]</sup>. AT1 拮抗剂还可抑制乳腺癌细胞增殖和血管形成<sup>[6]</sup>. miR-410 过表达可抑制 AT1 表达, 或干扰 AT1 表达水平, 都可抑制胰腺癌细胞生长和侵袭转移<sup>[7]</sup>.

uPA (尿激酶型纤溶酶原激活物, urokinase plasminogen activator) 系统包括 uPA、uPA 受体 (uPAR)、纤溶酶原激活物抑制子 (plasminogen activator inhibitor, PAI), 参与多种生理或病理活动过程, 如细胞分化、血管生成、细胞迁移、细胞外基质降解和组织重建等过程. 分析 2780 例原发性乳腺癌中 uPA 系统成员 (uPA, uPAR, PAI-1 和 PAI-2) 的表达量, 发现它们与患者的无复发存活率相关<sup>[8]</sup>. 目前研究结果已表明, uPA 在肿瘤侵袭转移过程中扮演更重要的角色<sup>[9]</sup>. 神经营养蛋白受体相关黑色素瘤抗原同源物 (neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog, NRAGE) 具有明显的促凋亡作用<sup>[10]</sup>, 抑制胰腺癌和恶性黑色素瘤细胞的浸润和转移, 是肿瘤生长和转移相关基因<sup>[11]</sup>.

本实验采用血管紧张素 II (Ang II) 处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 检测血管紧张素 II (Ang II) 对肿瘤细胞迁移以及 uPA-uPAR 和 NRAGE 等肿瘤细胞迁移有关基因表达的影响, 探讨血管紧张素 II (Ang II) 促进乳腺癌细胞迁移的机制.

收稿日期: 2017-05-08.

基金项目: 企业委托项目 (K11100BY62).

通讯联系人: 曹祥荣, 教授, 博导, 研究方向: 肿瘤发生与基因治疗分子机制. E-mail: 08085@njnu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 主要药品与试剂

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 为本实验室保存;RPMI 1640 和 DMEM 购自 Gibco BRL 公司;PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒、总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,SYBR Premix EX Taq(Perfect Real Time)试剂为 TAKARA 公司产品. 所用引物由上海生工合成.

### 1.2 细胞及培养

乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的培养条件分别为含 10%胎牛血清的 RPMI 1640、DMEM 高糖培养液,于 37 ℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养.

### 1.3 细胞划痕愈合实验

收集对数生长期乳腺癌细胞 MDA-MB-231,计数. 在 6 孔板中,铺细胞数量约  $4 \times 10^5$ . 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h. 吸去培养液,用移液枪枪尖在培养基表面划一条痕迹(长约 2 cm),用 PBS 洗 3 次,加入无血清的培养基及含 0.1 μm 及 1 μm 的 Ang II 继续培养. 分别在 0 h、24 h 时拍照,测量划痕愈合的距离,取 4 个视野尺寸进行数据统计.

### 1.4 细胞总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

收集 MDA-MB-231 细胞,按 Trizol 法说明提取细胞总 RNA,加入 RNase-free 的水 10 μL~20 μL 溶解沉淀. 测定 260 nm 和 280 nm 光吸收值的比值,A260/280 比值在 1.8~2.0 之间. 取总 RNA 各 500 ng,按 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明,合成 cDNA,所得 cDNA 在 -20 ℃ 保存备用.

### 1.5 Q-PCR 检测乳腺癌细胞中 mRNA 的表达

选取对数生长期乳腺癌细胞系 MDA-MB-231. 无血清培养细胞饥饿 12 h 后,换含 Ang II 无血清培养基(终浓度分别为 0.1 μm 和 1 μm)培养. 处理 24 h 后,提取其总 RNA,合成 cDNA. 以 actin 基因为内参,Q-PCR 检测 uPA-uPAR 及 NRAGE mRNA 的表达量.

Q-PCR 所用引物:

uPA 上:5'-GCCACCCTGGTGCTATGT-3';  
uPA 下:5'-CCCTTGCGTGTGGAGTT-3'.  
uPAR 上:5'-GTGGGAAGAAGGAGAAGAGC-3';  
uPAR 下:5'-GATGAGCCACAGGAAATGC-3'.  
PAI-2 上:5'-GGAGCATCTCGTCCACCA-3';  
PAI-2 下:5'-ATCGCATCAGGATAACTACC-3'.  
NRAGE 上:5'-GCTCGGTCTCCTCTTGGT-3';  
NRAGE 下:5'-GTTGCTGTTGGGCACTCG-3'.  
Actin 上:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3';  
Actin 下:5'-CTGGAAGGTGACAGCGAGG-3'.

具体步骤如下:

#### (1) 细胞总 RNA 抽提

取 6 孔板贴壁培养细胞,移去培养基,用冰冷 PBS 洗两次后加入 TRIZOL 试剂 1 mL,室温下放置 5 min,使其充分裂解后转移至 DEPC 处理的 EP 管中,每管加氯仿 200 μL,剧烈振荡 15 S,室温放置 5 min,于 4 ℃,12 000 g 离心 15 min. 小心吸取上层透明层于 DEPC 处理的 EP 管中,加等体积异丙醇(约 500 μL),混匀后室温下放置 10 min 以沉淀 RNA. 然后于 4 ℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清液,加入冰预冷的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,室温下干燥沉淀 10 min 至沉淀半透明,加入 RNase-free 的水 10 μL~20 μL 溶解沉淀并保存于 -80 ℃.(所用器具和试剂用 DEPC 处理)

#### (2) RNA 浓度测定

取 2 μL 上述提取的 RNA,用分光光度计测定 RNA 浓度,并读取在 260 nm 和 280 nm 波长的光吸收值的比值,A260/280 比值应在 1.8~2.0 之间.

(3)cDNA 合成

依次加入如下试剂,形成 10  $\mu$ L 的反转录反应体系

5 $\times$ PrimeScript <sup>TM</sup> Buffer( for Real Time)	2 $\mu$ L
PrimeScript <sup>TM</sup> RT Enzyme MixI	0.5 $\mu$ L
Oligo dT Primer( 50 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
Random 6 mers( 100 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
Total RNA	500 ng
RNase-free 的水	X $\mu$ L 补足
	10 $\mu$ L

将样品于 37  $^{\circ}$ C 加热 15 min,然后于 85  $^{\circ}$ C 加热 5 s. 合成的 cDNA 可于-20  $^{\circ}$ C 保存备用.

(4)Q-PCR

将上述逆转录 cDNA 稀释 10 倍用于 Q-PCR

cDNA	1 $\mu$ L
SRBR Premix Ex Taq <sup>TM</sup> II	7.5 $\mu$ L
PCR Forward Primer( 10 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
PCR Reverse Primer( 10 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
RNase-free 的水	4.5 $\mu$ L
总体积	15 $\mu$ L

反应体系 15  $\mu$ L,反应条件:95  $^{\circ}$ C 变性 1 min,95  $^{\circ}$ C 30 s、60  $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环.

2 结果

2.1 Q-PCR 检测乳腺癌细胞中 uPA 和 NRAGE 的 mRNA 表达水平

选取对数生长期乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 MCF-7,提取其总 RNA,Q-PCR 检测 uPA 系统各成员及 NRAGE mRNA 的表达. 从结果(图 1)中可以看出,在乳腺癌细胞中 uPA、uPAR,NRAGE 转录水平有差异,而 PAI-2 基因在两个细胞系中的表达量均很低.

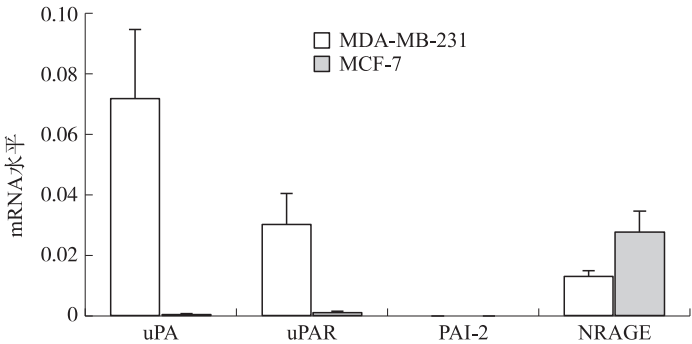


图 1 Q-PCR 检测乳腺癌细胞中 uPA-uPA 和 NRAGE 的 mRNA 表达( actin 为内参)

Fig. 1 The expression of the uPA-uPAR and NRAGE in MDA-MB-231 and MCF-7 cells by Q-PCR measurement

2.2 血管紧张素 II 可促进乳腺癌细胞的迁移

将乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞培养在六孔板上,待细胞长满后,用移液枪在中央区域画一条直线,用 PBS 将细胞清洗 3 次,除去这条直线区域内的细胞,用含 0.1  $\mu$ mol/L 或 1  $\mu$ m 的 Ang II 无血清培养基继续培养,测量细胞向无细胞的划痕区域迁移的距离,来判断细胞的迁移能力. 结果(图 2)表明,Ang II 能够明显地刺激 MDA-MB-231 细胞的迁移,当浓度为 0.1  $\mu$ mol/L 时促进细胞迁移的作用更为明显(1.51 倍),1  $\mu$ m 浓度处理时,迁移能力为1.31 倍.

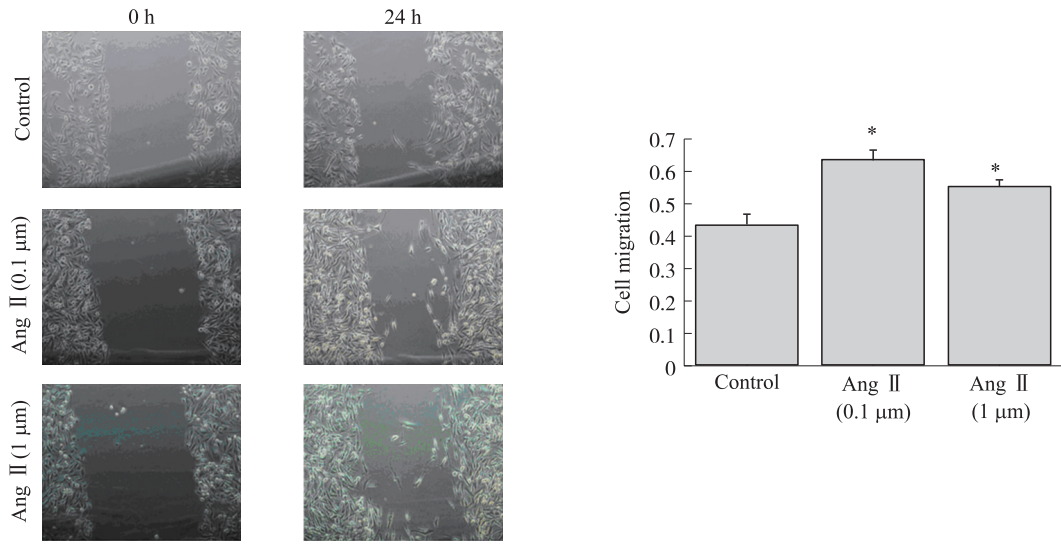


图 2 细胞划痕愈合实验检测 Ang II 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响  
Fig. 2 The effect of the angiotensin II on the migration of MDA-MB-231 cells by wound healing assay

2.3 Ang II 增强乳腺癌细胞中 uPA-uPAR 和 NRAGE 表达水平

选取对数生长期乳腺癌细胞系 MDA-MB-231, 细胞经 0.1 μm 及 1 μm 浓度的 Ang II 处理后, 提取细胞总 RNA, 以 actin 转录水平为内参, Q-PCR 检测 uPA-uPAR 及 NRAGE mRNA 的表达量变化(图 3). 实验结果显示, 当 Ang II 的浓度为 0.1 μm 和 1 μm 处理时, 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中 uPA 的转录水平分别增加到 2.97 倍和 2.38 倍; 同时刺激 uPAR mRNA 有一定的升高. 用 0.1 μm 和 1 μm Ang II 处理时, MDA-MB-231 细胞中 NRAGE 的 RNA 表达量分别提高到 3.55 倍和 2.73 倍.

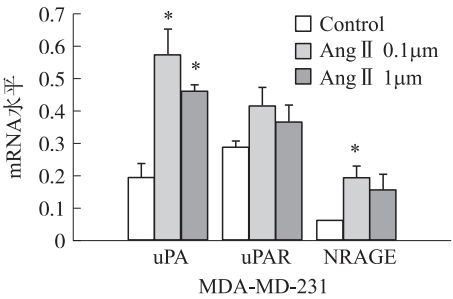


图 3 Q-PCR 检测 Ang II 对 MDA-MB-231 细胞中 uPA 系统及 NRAGE 基因 mRNA 的影响( actin 为内参)  
Fig. 3 The expression of the uPA-uPAR and NRAGE in MDA-MB-231 cells treated with angiotensin II by Q-PCR measurement

3 讨论

乳腺癌是女性发病率高且恶性程度高的肿瘤, 有研究结果表明乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞表面发现 uPA 的增多会增加纤溶酶原的活化, 引起细胞蛋白水解活力的提高<sup>[12]</sup>. 在载脂蛋白 E 缺陷的小鼠中, Ang II 能增加 uPA 的表达率并诱导腹主动脉瘤<sup>[13]</sup>. 血管紧张素 II 可促进乳腺癌细胞金属蛋白酶 MMP2、MMP9 的表达水平, 增强细胞表面蛋白水解能力, 继而促进乳腺癌细胞迁移和局部侵袭作用<sup>[14]</sup>. 血管紧张素 II 可降低整联蛋白 integrin α3 和 β1, 继而增强乳腺癌细胞黏附和侵袭能力<sup>[15]</sup>. 因此认为肿瘤患者血浆中血管紧张素 II 可以作为癌症恶性的指标<sup>[16]</sup>.

本研究结果已显示 Ang II 可以促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移. 当用不同浓度的 Ang II 刺激细胞时, 在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中 Ang II 能够明显地刺激 uPA 的转录, uPAR RNA 量也有一定的增长, 增强细胞的迁移能力. 有研究结果显示, NRAGE 在细胞生命活动中的作用是多元化的, 但其功能的发挥与其相互作用的配体蛋白有关, NRAGE 具有促进凋亡和抑制恶性黑色素瘤转移的能力<sup>[11]</sup>. 本实验中 Ang II 促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移情况下, 也能够促进 NRAGE 的表达. 在肝细胞癌中也观察到, NRAGE 高水平表达时, 促进肝细胞癌的恶性表型<sup>[17]</sup>.

Ang II 刺激乳腺癌细胞 uPA 和 uPAR 的表达, 可能是 Ang II 促进乳腺癌细胞迁移, 继而促进肿瘤血管生成和肿瘤生长转移的原因之一.

致谢: 感谢南京师范大学生命科学学院温传俊老师对本实验的指导和支持!

## [参考文献]

- [1] KINOSHITA J, FUSHIDA S, HARADA S, et al. Local angiotensin Ⅱ-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF- $\kappa$ B and surviving[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(6): 1 573–1 582.
- [2] PUDDEFOOT J R, UDEOZO U K I, BARKER S, et al. The role of angiotensin Ⅱ in the regulation of breast cancer cell adhesion and invasion[J]. *Endocrine-related cancer*, 2006, 13: 895–903.
- [3] SUGANUMA T, INO K, SHIBATA K, et al. Functional expression of the angiotensin Ⅱ type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2 686–2 694.
- [4] OH E, KIM J Y, CHO Y, et al. Over-expression of angiotensin Ⅱ type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(6 Pt A): 1 071–1 081.
- [5] FUJIHARA S, MORISHITA A, OGAWA K, et al. The angiotensin Ⅱ type 1 receptor antagonist telmisartan inhibits cell proliferation and tumor growth of esophageal adenocarcinoma via the AMPKa/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8 536–8 549.
- [6] CHEN X, MENG Q, ZHAO Y, et al. Angiotensin Ⅱ type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 318–324.
- [7] GUO R, GU J, ZHANG Z, et al. MicroRNA-410 functions as a tumor suppressor by targeting angiotensin Ⅱ type 1 receptor in pancreatic cancer[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(1): 42–53.
- [8] FOEKENS J A, PETERS H A, LOOK M P, et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 636–643.
- [9] 王学谦, 林洪生. uPA/uPAR 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(9): 16–17.
- [10] SALEHI A H, XANTHOUDAKIS S, BARKER P A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK dependent mitochondrial pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48 043–48 050.
- [11] CHU, C S, CHU C S, XUE B, et al. NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 268–275.
- [12] STILLFRIED G E, SAUNDERS D N, RANSON M. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity[J]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(1): R14.
- [13] WANG Y X, MARTIN-MCNULTY B, FREAY A D, et al. Angiotensin Ⅱ increases urokinase-type plasminogen activator expression and induces aneurysm in the abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4): 1 455–1 464.
- [14] RODRIGUES-FERREIRA S R, ABDELKARIM M, DILLENBURG-PILLA P, et al. Angiotensin Ⅱ facilitates breast cancer cell migration and metastasis[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35667.
- [15] PUDDEFOOT J R, UDEOZO U K I, BARKER S, et al. The role of angiotensin Ⅱ in the regulation of breast cancer cell adhesion and invasion[J]. *Endocrine-related cancer*, 2006, 13: 895–903.
- [16] PENAFUERTE C A, GAGNON B, SIROIS J, et al. Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin Ⅱ as biomarkers of cancer cachexia[J]. *Br J Cancer*, 2016, 114(6): 680–687.
- [17] SHIMIZU D, KANDA M, SUGIMOTO H, et al. NRAGE promotes the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncology Lett*, 2016, 11: 1 847–1 854.

[责任编辑:黄 敏]