



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.007
Chinese Journal of General Surgery, 2021, 30(11):1318-1326.

· 基础研究 ·

三阴性乳腺癌细胞脂肪非典型钙黏蛋白4表达下调的生物学作用及机制

蒲卢兰^{1,2}, 谢少利¹, 李金穗¹, 苏小涵¹, 谭巧¹, 高砚春¹, 邓世山^{1,2}, 侯令密^{1,3}

[1. 川北医学院附属医院 甲状腺乳腺外科、乳腺癌生物靶向研究室、院士(专家)工作站, 四川南充 637000; 2. 川北医学院解剖学教研室, 四川南充 637000; 3. 四川大学华西医院营山医院 甲状腺乳腺外科, 四川南充 637000]

摘要

背景与目的: 三阴性乳腺癌(TNBC)容易发生侵袭转移, 恶性程度极高。笔者团队前期研究发现脂肪非典型钙黏蛋白4(FAT4)在TNBC组织中呈低表达且与预后相关, 进而本研究进一步探讨FAT4对TNBC细胞生物学行为的影响, 及其相关机制。

方法: 用qRT-PCR及Western blot检测正常人乳腺上皮细胞系(MCF-10A)及不同TNBC细胞系(BT-549、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-436)中FAT4的表达水平。选择其中合适的TNBC细胞系, 分别转染FAT4-shRNA(FAT4敲低组)、阴性对照序列(阴性对照组), 以未处理的TNBC细胞为空白对照组, 分别采用CCK-8实验、流式细胞术、Transwell小室实验检测细胞增殖能力、凋亡率、侵袭与转移能力的变化, 并用Western blot检测细胞中Hippo信号通路下游靶点YAP及上皮间质转化(EMT)相关蛋白的变化。

结果: 与正常人乳腺上皮细胞比较, 各TNBC细胞系中FAT4的mRNA与蛋白表达量均不同程度的降低(均 $P<0.05$)。功能实验选用BT-549细胞和MDA-MB-436细胞。无论在BT-549细胞或MDA-MB-436细胞中, 与空白对照组比较, FAT4敲低组在转染后24、48、72 h的增殖能力均明显升高、凋亡率明显降低、侵袭与转移能力明显增强(均 $P<0.05$); YAP蛋白表达量无明显变化($P>0.05$), 但磷酸化YAP(p-YAP)表达量明显降低, 上皮标志物E-cadherin水平明显降低, 而间质标志物N-cadherin水平明显升高(均 $P<0.05$); 阴性对照组与空白对照组间以上指标差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

结论: FAT4表达水平在TNBC细胞中普遍降低, FAT4表达的降低能增强TNBC细胞增殖和侵袭转移能力、减少TNBC细胞凋亡, 其机制可能与FAT4降低后Hippo信号通路下游的YAP蛋白磷酸化减少, 从而促进EMT进程有关。

关键词

三阴性乳腺癌; 脂肪非典型钙黏蛋白4; 细胞增殖; 肿瘤浸润; 上皮-间质转化

中图分类号: R737.9

基金项目: 四川省科技厅基础科研基金资助项目(19YYJC0384); 四川省中医药管理局中医药基础项目(2020JC0055); 南充市市校合作科研创新团队建设专项(20SXCTD0001)。

收稿日期: 2021-05-22; **修订日期:** 2021-10-14。

作者简介: 蒲卢兰, 川北医学院附属医院硕士研究生, 主要从事乳腺肿瘤基础方面的研究(谢少利为共同第一作者)。

通信作者: 邓世山, Email: dssgeneral@163.com; 侯令密, Email: houlingmi@163.com

Biological actions of down-regulation of FAT atypical cadherin 4 in triple negative breast cancer cells and the mechanism

PU Lulan^{1,2}, XIE Shaoli¹, LI Jinsui¹, SU Xiaohan¹, TAN Qiao¹, GAO Yanchun¹, DENG Shishan^{1,2}, HOU Lingmi^{1,3}

[1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Biological Targeting Laboratory of Breast Cancer, Academician (expert) Workstation, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Anatomy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of Thyroid and Breast Surgery, Yingshan Hospital of West China Hospital, Sichuan University, Nanchong, Sichuan 637000, China]

Abstract

Background and Aims: Triple negative breast cancer (TNBC) is more prone to invasion and metastasis, with a high degree of malignancy. Previous study of the authors' team found the low expression of Fat atypical cadherin 4 (FAT4) in TNBC tissue and its prognostic relevance. Thus, this study was conducted to further investigate the effects of FAT4 on the biological behavior of TNBC cells and the associated mechanism.

Methods: The expression levels of FAT4 in normal mammary epithelial cell line (MCF-10A) and different TNBC cell lines (BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, and MDA-MB-436) were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. Then, the suitable TNBC cell lines were selected, and were transfected with FAT4-shRNA (FAT4 knockdown group) or scrambled sequences (negative control group), using untransfected TNBC cells as blank control group. In these cells, the changes in proliferation ability, apoptosis rate, and invasion/metastasis ability were determined by CCK-8 assay, flow cytometry and Transwell chamber assay, respectively. Meanwhile, the changes in YAP protein, a downstream target of the Hippo signaling pathway, as well as the epithelial mesenchymal transformation (EMT)-related proteins were also examined by Western blot analysis.

Results: Compared with normal mammary epithelial cell line, the mRNA and protein expression levels of FAT4 in all the studied TNBC cell lines were decreased with varying degrees (all $P < 0.05$). The BT-549 and MDA-MB-436 cells were selected for functional experiments. In FAT4 knockdown group compared with blank control group of either the BT-549 or MDA-MB-436 cells, the proliferative abilities were significantly increased at 24, 48, and 72 h after transfection, the apoptosis rate was significantly decreased, and the invasion/metastasis ability was significantly enhanced (all $P < 0.05$); the expression level of YAP protein showed no significant change ($P > 0.05$), but the level of phosphorylated YAP (p-YAP) was significantly decreased, and the level of epithelial marker E-cadherin was significantly decreased and mesenchymal marker N-cadherin was significantly increased (all $P < 0.05$); the differences in all above parameters showed no statistical significance between negative control group and blank control group (all $P > 0.05$).

Conclusion: The expression of FAT4 is generally down-regulated in TNBC cells. The FAT4 down-regulation can enhance the proliferation and invasion/migration abilities and weaken the apoptosis of TNBC cells, and the mechanism may be probably associated the reduced phosphorylation of YAP protein in downstream Hippo signaling pathway after FAT4 down-regulation, and thereby promoting the EMT process.

Key words

Triple Negative Breast Neoplasms; Fat Atypical Cadherin 4; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness; Epithelial-Mesenchymal Transition

CLC number: R737.9

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是一种雌孕激素受体及 HER-2 表达均呈阴性且恶性程度极高的乳腺肿瘤, 因为缺乏特异性的治疗靶标, 临床预后极差, 寻找 TNBC 早期诊断和治疗的靶点尤其重要^[1-2]。课题组前期研究发现脂肪非典型钙黏蛋白 4 (FAT4) 在 TNBC 组织中呈低表达, FAT4 的低表达与 TNBC 患者的恶性生物学特征 (淋巴结转移、组织学分级等) 及不良预后密切相关^[3-4]。但是 FAT4 影响 TNBC 的具体机制尚不明确。相关研究表明 FAT4 作为 Hippo 信号通路的上游因子, 能够诱导该通路的磷酸化影响肿瘤细胞的功能表型^[5-8]。为进一步研究 FAT4 对 TNBC 恶性生物学行为的影响, 探讨 FAT4 在 TNBC 中的作用机制。本研究通过细胞学模型检测降低 FAT4 表达水平后 TNBC 细胞系生物学行为 (增殖与凋亡、迁徙与侵袭) 的改变, 并检测细胞 EMT 表型及通路下游蛋白 YAP 的表达及磷酸化改变, 初步探讨其相关性机理, 旨在为 FAT4 调节 TNBC 增殖与凋亡、侵袭与转移的机制提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A 及 TNBC 细胞系 BT-549、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-436 均购于中国科学院细胞总库; 川北医学院分子免疫研究所提供转染所需大肠杆菌 DH5 α 菌; 慢病毒载体介导的 FAT4 沉默体系及对照, 由上海吉凯基因化学技术有限公司负责构建及包装。

1.2 主要仪器设备

细胞培养箱: 德国 HERAEUS 公司; 冷冻离心机: 美国 THERMO 公司; -80 °C 冰箱: 英国 ABCAM 公司; 流式细胞仪: 美国 BD 公司; PCR 仪: 美国 BIO-RAD 公司; 超纯水器: 中国四川卓越水处理设备有限公司; 普通显微镜: 日本 OLYMPUS 公司。

1.3 主要实验试剂

胎牛血清: 美国 GIBCO 公司; RPMI-1640 培养基/胰蛋白酶: 美国 HYCLONE 公司; 青/链霉素: 美国 INVITROGEN 公司; shRNA-FAT4/shRNA-Negative Control: 中国上海吉凯基因化学技术有限公司; DEPC: 美国 SIGMA 公司; CHAPS: 美国 AMRESCO 公司; Western blot 电泳液/转膜液/洗涤

液: 中国碧天云公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒: 中国凯基生物公司; CCK-8 试剂盒: 中国凯基生物公司; Transwell 试剂盒: 美国 MILLIPORE 公司; 抗 FAT4 抗体 (Western blot) /抗 β -actin 多克隆抗体/抗 GAPDH 抗体: 英国 ABCAM 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 将 RPMI-1640 培养液中加入 10% 胎牛血清、 1×10^5 IU/L 链霉素、 1×10^5 IU/L 青霉素, 制成培养液。正常人乳腺细胞株 MCF-10A 及 TNBC 细胞株 BT-549、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-436 在恒温细胞培养箱中培养 (37 °C, 5%CO₂)。

1.4.2 检测 FAT4 在 TNBC 细胞株中的表达水平 按照 GIBCO 公司 RNA 提取试剂盒操作说明提取细胞总 RNA; BIO-RAD 公司蛋白质提取试剂盒操作说明书提取总蛋白; qRT-PCR 技术及 Western blot 技术检测各细胞系中 FAT4 的 mRNA 及蛋白质的相对表达量。

1.4.3 构建及鉴定 FAT4 低表达细胞系 FAT4-shRNA 干扰序列 (FAT4-shRNA1/2/3) 及阴性对照序列由上海吉凯基因化学有限公司设计合成。选择 pGPU6/GFP/Neo 质粒作为载体包装 shRNA, 通过转染感受态大肠杆菌扩增质粒。293T 细胞接种到 6 孔板进行转染实验。BT-549、MDA-MB-436 细胞系进行感染, 提取细胞总 RNA; qRT-PCR 检测各组细胞 FAT4 mRNA 的相对表达情况; 提取细胞总蛋白; Western blot 检测各组细胞 FAT4 蛋白的相对表达情况 (一抗: 抗 FAT4 抗体, 1:1 000, ab130076, Abcam; 二抗: 碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG, 1:2 000, A0239, 碧天云)。筛选出最有效的干扰片段进行后续实验, 将 TNBC 分别转染 FAT4-shRNA (FAT4 敲低组) 和阴性对照序列 (阴性对照组), 以未转染的 TNBC 作为空白对照组。

1.4.4 细胞增殖实验 (CCK-8 实验) 将 2×10^3 孔的细胞悬液加入 96 孔板培养; 将培养板分别培养细胞 24、48、72 h 后每孔加入 CCK8 试剂 10 μ L; 孵育 1 h (37 °C, 5%CO₂); 根据酶标仪测定吸光值分析细胞生长情况。

1.4.5 细胞凋亡实验 取转染 72 h 后细胞, 无血清培养基饥饿 8 h, 吸取 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞后加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI; 设置流式细胞仪工作程序 (激发波长 Ex=488 nm; 发射波长 Em=530 nm); Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC

通道 (FL1) 检测; PI 红色荧光通过 PI 通道 (FL3) 检测, Flowjo v10 软件进行数据的统计与分析。

1.4.6 细胞迁徙实验 将小室放入 24 孔板, 在上室加入基质胶, 将小室的下室面均匀涂抹纤维蛋白 (10 mg/L), 更换无血清培养基让细胞饥饿培养 8 h; 在 Transwell 小室的上层小室中加入 200 μ L 细胞悬液, 下层小室加入含 10% 的胎牛血清 RPMI-1640 培养基; 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 4 h; 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色微孔膜下面细胞; 显微镜下选取 3 个视野计数 (200 \times), 重复 3 次取平均值。

1.4.7 Western blot 实验 按比例制备 SDS-PAGE 胶, 50 μ g 蛋白样品加入上样孔槽中, 转膜, TBST 液将 PVDF 膜浸泡, 平衡, 封闭, 一抗孵育 (一抗: 抗 E-cadherin 抗体, 1:2 000, ab133597, Abcam; 抗 N-cadherin 抗体, 1:2 000, ab76057, Abcam), 二抗孵育 (碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG, 1:2 000, A0239, 碧云天), PVDF 膜置于暗室, 用 BICP/NBT phosphatase Substrate (KPL, 美国) 避光显色; 扫描并保存图像。

1.5 统计学处理

实验中涉及的所有需要进行统计学处理的实验数据, 均采用 SPSS 26.0 for Windows 统计软件进行分析, 部分图片由 GraphPad Prism 9 输出。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用

方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAT4 在 TNBC 细胞系中的表达

以正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A 中 FAT4 mRNA 表达量为参照, 4 种 TNBC 细胞系中 FAT4 mRNA 相对表达量分别为 BT-549: 0.7012 ± 0.044 、MDA-MB-231: 0.2899 ± 0.035 、MDA-MB-468: 0.346 ± 0.065 、MDA-MB-436: 0.5484 ± 0.028 , FAT4 mRNA 在各组细胞中表达有明显差异 ($F=169.842$, $P=0.000$); 相对于正常细胞系 MCF-10A, 各组的相对表达水平降低 (均 $P < 0.05$)。在 4 种 TNBC 细胞系中, BT-549 和 MDA-MB-436 细胞系中相对表达量较高 (图 1A)。以 MCF-10A 中 FAT4 蛋白表达量为参照, TNBC 细胞系中 FAT4 蛋白相对表达量分别为 BT-549: 0.7225 ± 0.071 、MDA-MB-231: 0.4225 ± 0.039 、MDA-MB-468: 0.4194 ± 0.056 、MDA-MB-436: 0.6975 ± 0.063 ; FAT4 蛋白在各组细胞中表达有明显差异 ($F=96.707$, $P=0.000$); 相对于正常细胞系 MCF-10A, 各组的相对表达水平降低 (均 $P < 0.05$)。在 4 种 TNBC 细胞系中, BT-549 和 MDA-MB-436 细胞系中相对表达量较高 (图 1B)。遂选取 BT-549 和 MDA-MB-436 细胞系进行后续实验。

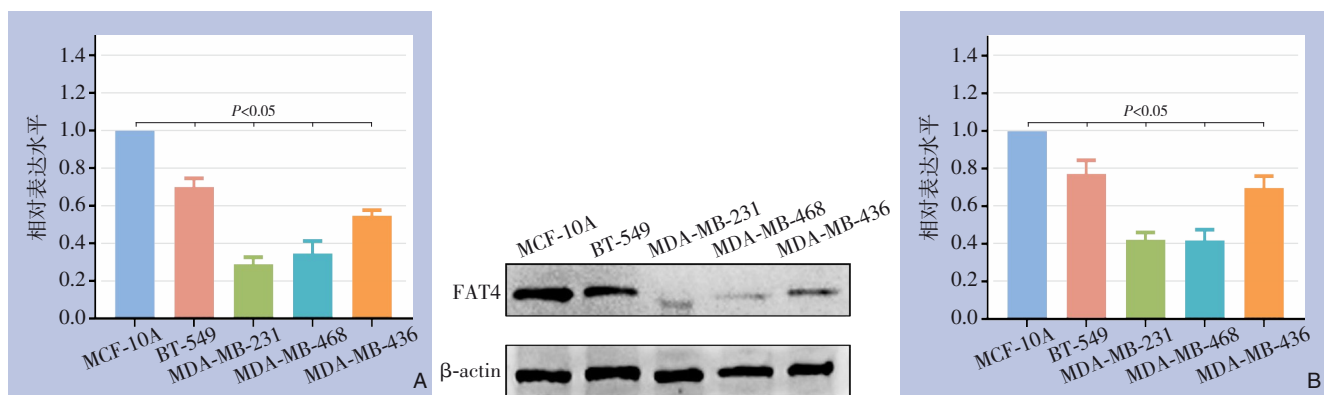


图 1 FAT4 mRNA 及蛋白在各细胞系中的表达 A: qRT-PCR 检测 FAT4 mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测 FAT4 蛋白相对表达量

Figure 1 Expressions of FAT4 mRNA and protein in cells of each cell line A: Relative expression levels of FAT4 mRNA determined by qRT-PCR; B: Relative expression levels of FAT4 protein determined by Western blot

2.2 下调 FAT4 表达对 TNBC 细胞系的增殖能力的影响

在 BT-549 细胞系中, 转染 24、48、72 h 各组细胞 OD 值: 空白对照组分别为 0.322 ± 0.032 、

0.467 ± 0.042 、 0.563 ± 0.063 ; 阴性对照组分别为 0.341 ± 0.043 、 0.493 ± 0.053 、 0.586 ± 0.084 ; FAT4 敲低组分别为 0.492 ± 0.053 、 0.675 ± 0.084 、 0.782 ± 0.065 。3 个时间点各组间 OD 值差异均有统计学意

义 ($F=22.38$, $P=0.000$; $F=16.538$, $P=0.000$; $F=14.294$, $P=0.001$); 其中, FAT4 敲低组在 3 个时间的 OD 值均明显高于空白对照组与阴性对照 (均 $P<0.05$), 而后两组在 3 个时间点的 OD 值差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。在 MDA-MB-436 细胞系中, 24、48、72 h 各组细胞 OD 值: 空白对照组分别为 0.333 ± 0.076 、 0.396 ± 0.086 、 0.505 ± 0.048 ; 阴性对照组分别为 0.374 ± 0.042 、 0.432 ± 0.046 、 $0.532 \pm$

0.104 ; FAT4 敲低组分别为 0.457 ± 0.046 、 0.556 ± 0.093 、 0.798 ± 0.096 。3 个时间点各组间 OD 值差异均有统计学意义 ($F=6.308$, $P=0.013$; $F=5.801$, $P=0.017$; $F=5.801$, $P=0.017$)。其中, FAT4 敲低组在 3 个时间的 OD 值均明显高于空白对照组与阴性对照 (均 $P<0.05$), 而后两组在 3 个时间点的 OD 值差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 2)。

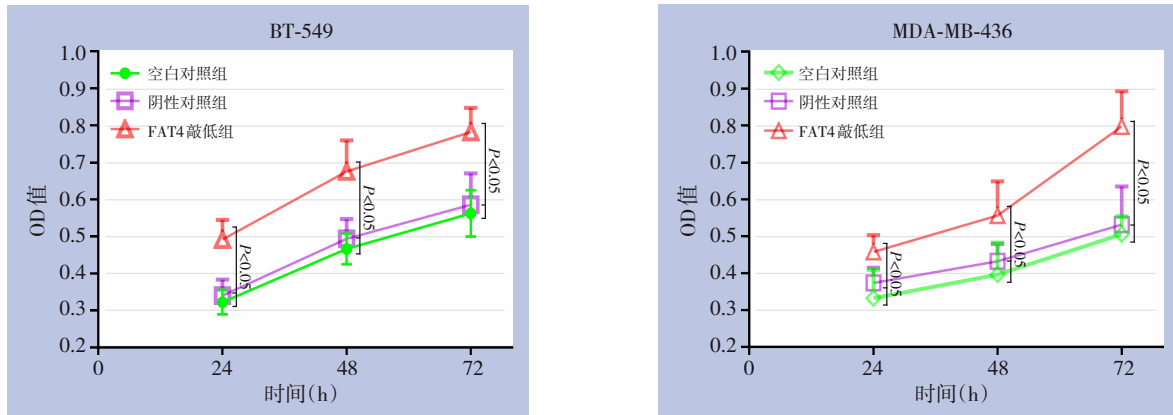


图2 下调 FAT4 对 BT-549 和 MDA-MB-436 细胞系的增殖能力的影响

Figure 2 Effect of down-regulation of FAT4 on the proliferation of BT-549 and MDA-MB-436 cell lines

2.3 下调 FAT4 表达对 TNBC 细胞系凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, 在 BT-549 细胞中的凋亡率分别为: 空白对照组 (15.16 ± 0.62)%、阴性对照组 (17.24 ± 0.27)%、FAT4 敲低组 (7.0 ± 0.94)%, FAT4 敲低组的凋亡率明显低于空白对照组与阴性对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组的细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$); 在 MDA-MB-436 细胞中的凋亡率分别为: 空白对照组 (18.31 ± 0.55)%、阴性对照组 (20.27 ± 0.47)%、FAT4 敲低组 (8.90 ± 0.48)%, FAT4 敲低组的凋亡率明显低于空白对照组与阴性对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组的细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 3)。

2.4 下调 FAT4 对 TNBC 细胞系迁移和侵袭能力的影响

Transwell 小室实验结果发现, 降低 FAT4 表达水平后, 在 BT-549 细胞系中, 各组穿室细胞数分别为: 空白对照组 (39 ± 6) 个、阴性对照组 (44 ± 5) 个、FAT4 敲低组 (59 ± 10) 个, 各组间差异有统计学意义 ($F=9.617$, $P=0.003$)。其中, FAT4 敲低组的穿室细胞数明显多于空白对照组与阴性对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组的穿室细胞数

差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在 MDA-MB-436 细胞系中, 各组穿室细胞数分别为: 空白对照组 (36 ± 7) 个、阴性对照组 (42 ± 9) 个、FAT4 敲低组 (62 ± 9) 个, 各组间差异有统计学意义 ($F=13.942$, $P=0.001$)。其中, FAT4 敲低组的穿室细胞数明显多于空白对照组与阴性对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组的穿室细胞数差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 4)。

2.5 下调 FAT4 表达水平对 TNBC 细胞系 Hippo 信号通路的影响

在 BT-549 细胞系中, 以空白对照组为参照, 阴性对照组、FAT4 敲低组中 YAP 蛋白相对表达量为 0.954 ± 0.062 、 0.942 ± 0.04 ; 磷酸化 YAP (p-YAP) 蛋白相对表达量为 0.963 ± 0.079 、 0.263 ± 0.088 ; E-cadherin 相对表达量为 0.972 ± 0.025 、 0.234 ± 0.032 ; N-cadherin 相对表达量为 0.982 ± 0.044 、 1.796 ± 0.092 。各组间 YAP 蛋白表达无明显差异 ($F=2.636$, $P=0.1125$); 各组间 p-YAP 蛋白表达有明显差异 ($F=143.537$, $P=0.000$), 其中, FAT4 敲低组 p-YAP 蛋白表达量明显低于阴性对照组与空白对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各组间 E-cadherin 与

N-cadherin 表达量均有明显差异 ($F=394.452, P=0.000; F=212.208, P=0.000$), 其中, FAT4 敲低组的 E-cadherin 表达量较阴性对照组与空白对照组明显降低, 而 N-cadherin 表达量较阴性对照组与空白对照组明显升高 (均 $P<0.05$), 而阴性对照组与空白对照组间 E-cadherin 与 N-cadherin 表达量差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。在 MDA-MB-436 细胞系中, 以空白对照组为参照, 阴性对照组、FAT4 敲低组中 YAP 蛋白相对表达量为 0.961 ± 0.035 、 0.972 ± 0.029 ; p-YAP 蛋白相对表达量为 0.964 ± 0.031 、 0.275 ± 0.032 ; E-cadherin 相对表达量为 0.948 ± 0.046 、 0.194 ± 0.056 ; N-cadherin 相对表达量为 0.963 ± 0.049 、 2.181 ± 0.193 。各组间 YAP 蛋白表

达无明显差异 ($F=2.397, P=0.133$); 各组间 p-YAP 蛋白表达有明显差异 ($F=400.352, P=0.000$), 其中, FAT4 敲低组 p-YAP 蛋白表达量明显低于阴性对照组与空白对照组 (均 $P<0.05$), 而后两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各组间 E-cadherin 与 N-cadherin 表达量均有明显差异 ($F=390.204, P=0.000; F=160.888, P=0.000$), 其中, FAT4 敲低组的 E-cadherin 表达量较阴性对照组与空白对照组明显降低, 而 N-cadherin 表达量较阴性对照组与空白对照组明显升高 (均 $P<0.05$), 而阴性对照组与空白对照组间 E-cadherin 与 N-cadherin 表达量差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 5)。

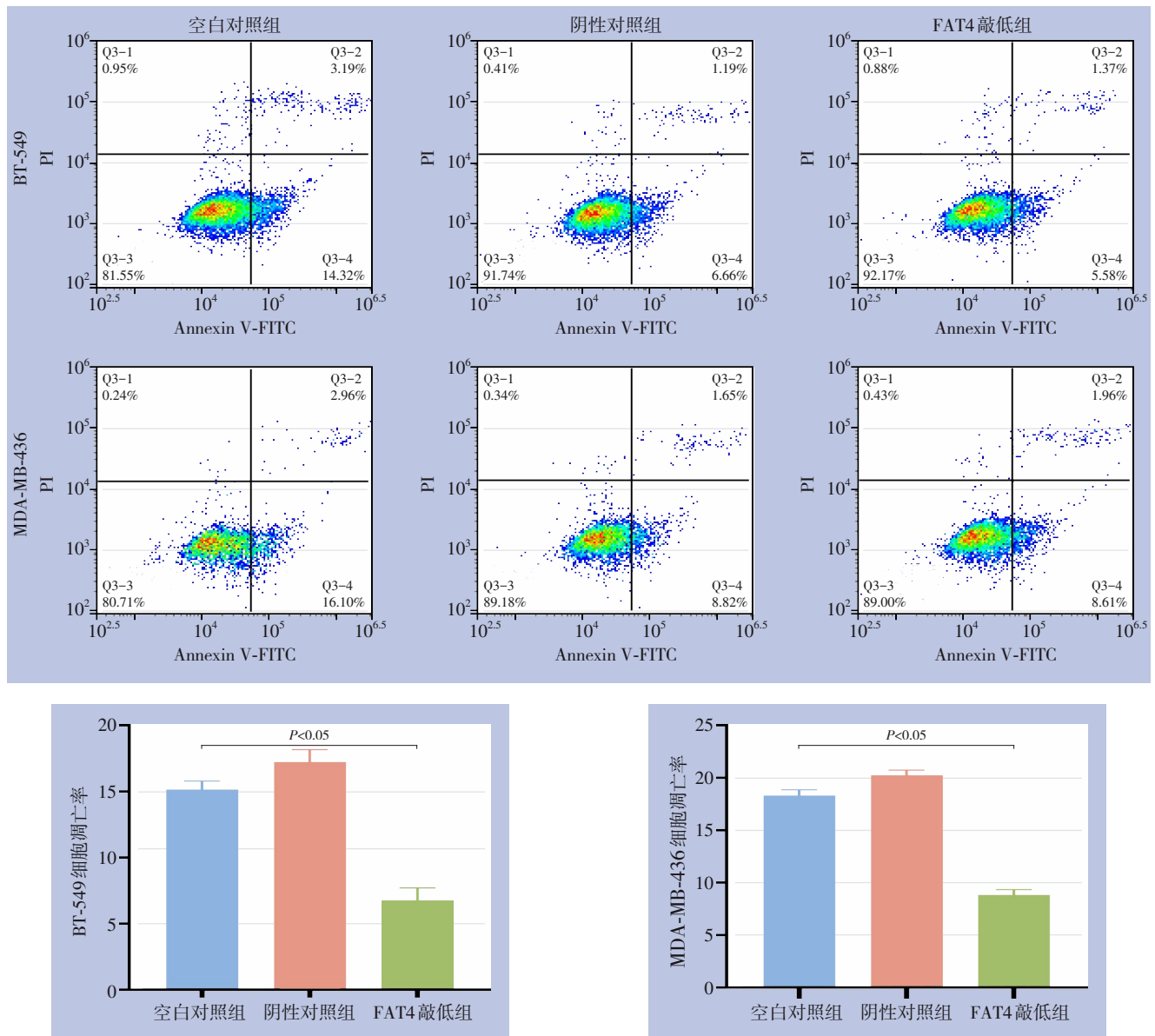


图 3 下调 FAT4 对 BT-549 和 MDA-MB-436 细胞系凋亡的影响

Figure 3 Effect of down-regulation of FAT4 on apoptosis of BT-549 and MDA-MB-436 cell lines

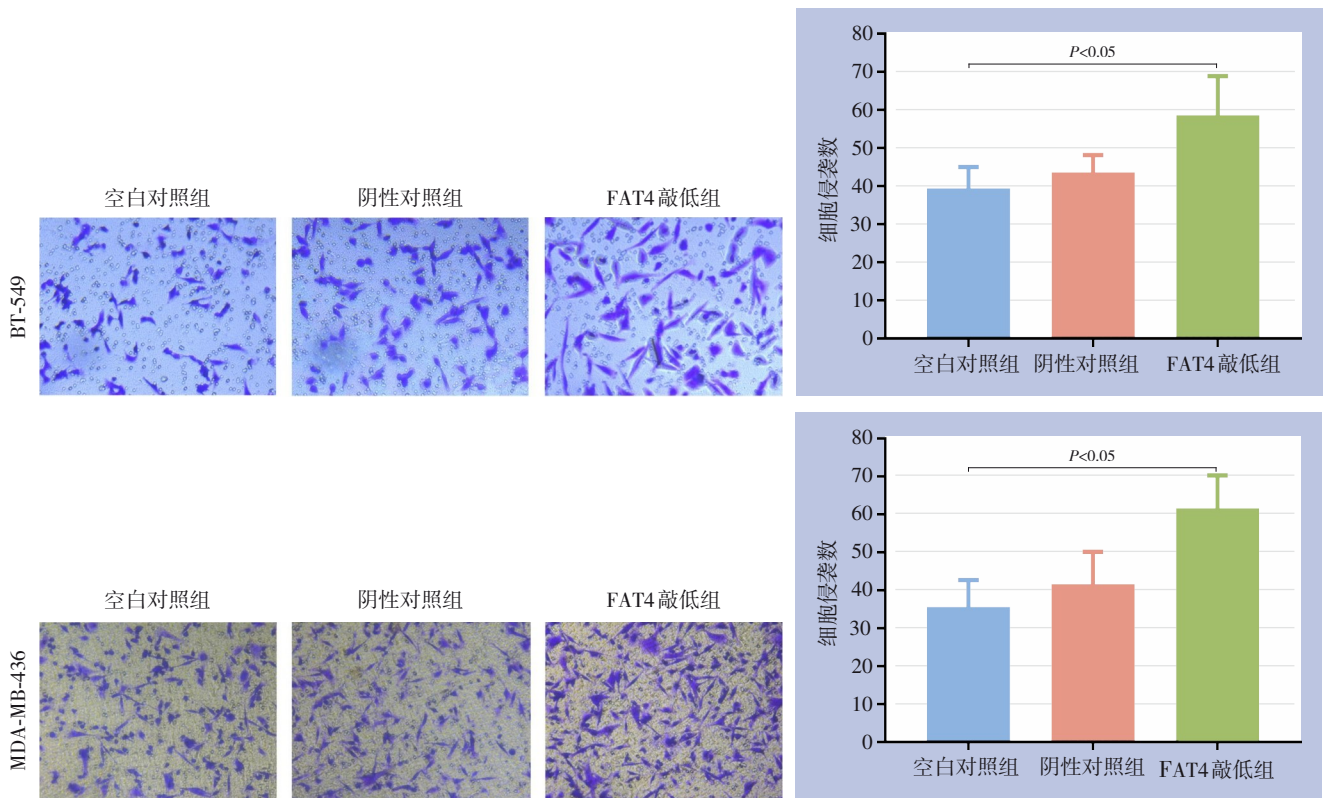


图4 下调FAT4对BT-549和MDA-MB-436细胞系迁移和侵袭能力的影响

Figure 4 Effect of down-regulation of FAT4 on migration/invasion abilities of BT-549 and MDA-MB-436 cell lines

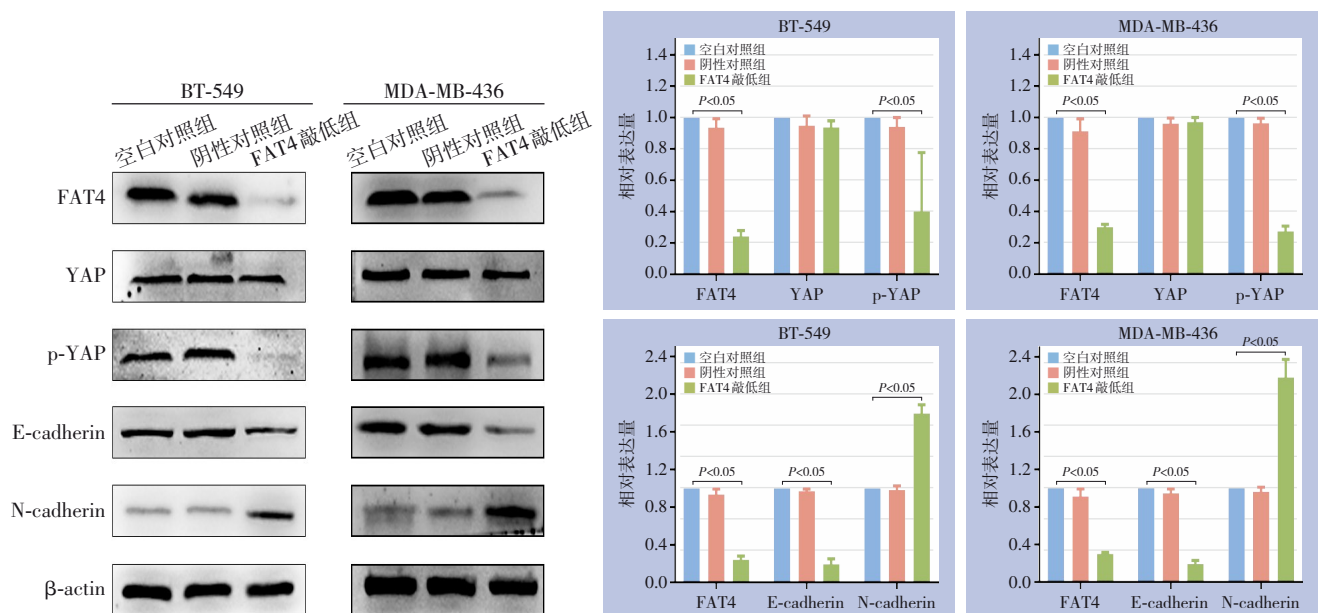


图5 下调FAT4对TNBC细胞系Hippo信号通路和EMT表型的影响

Figure 5 Effect of down-regulation of FAT4 on Hippo signaling pathway and EMT phenotype in TNBC cell lines

3 讨论

TNBC作为一种恶性程度极高的乳腺癌亚型，受到科研与临床的高度重视^[9-11]。尽管国际上开展了大量的针对性临床试验，但其治疗现状一直未

得到较好的改善^[9, 12-13]。目前迫切需要寻找有效诊断TNBC的特异性治疗靶点，临床策略提供新径。

本研究筛选了FAT4相对稳定高表达的TNBC细胞系BT-549和MDA-MB-436进行细胞功能验证实验。CCK-8实验发现降低FAT4表达后，BT-549和

MDA-MB-436 细胞系的增殖能力显著加强。细胞的增殖能力作为肿瘤细胞的一个特异性标志,与肿瘤的恶性程度直接相关^[14-15]。Ragni 等^[16]通过对小鼠心肌细胞的体内模型研究发现, FAT4 可能通过 Hippo 通路调节下游 YAP 核转位促进心肌细胞的增殖能力, FAT4 突变的小鼠因 FAT4 低表达导致心肌细胞增殖能力增加而心肌更肥厚。细胞凋亡是一个严格调控的生物学过程,在参与组织重塑、维持组织稳态平衡和促进损伤修复中起着重要作用^[17]。凋亡的调节失衡可能与恶性肿瘤的发生有着极为紧密的联系^[18-19]。Ma 等^[20]通过流式细胞仪检测发现降低 FAT4 表达能够减弱胃癌细胞的凋亡能力。本研究通过流式细胞术发现,降低 FAT4 表达能够抑制细胞的凋亡能力,促进肿瘤细胞的恶性发展。Transwell 小室实验显示, FAT4 低表达后细胞侵袭转移能力显著加强,说明在 TNBC 的恶性生物学进程上, FAT4 起到了重要的调节作用。Ma 等^[20]通过细胞学模型也发现 FAT4 低表达后胃癌细胞侵袭转移能力增强,可能与细胞上皮间质转化有关,而上皮间质转换的表达能直接引起细胞侵袭转移能力的增强。

Western blot 检测上皮细胞和间充质细胞表面标志物的变化,结果发现 FAT4 敲低组中 TNBC 细胞的上皮细胞表面分子 E-cadherin 表达显著降低,间质细胞表面分子 N-cadherin 表达显著增高。说明 FAT4 的低表达在一定程度上促进了 EMT 的生物学进程。而 EMT 作为一个特殊生理环境下的生物学状态,在许多肿瘤的远处转移中均被实验证明 EMT 的存在^[21-25]。能够引起 EMT 表型的变化,无疑是 FAT4 影响 TNBC 细胞侵袭与转移最直接的证据。Zhou 等^[26]建立小鼠转移性乳腺癌模型,通过对原发肿瘤、循环血液和转移灶中的肿瘤细胞进行提取分析,结果显示乳腺癌转移的病理生理过程是由癌细胞的动态 EMT 所介导的,阻断 EMT 可能成为防治乳腺癌转移的新策略。Cai 等^[27]发现敲除 FAT4 后胃癌细胞增殖和转移能力增强,且 FAT4 通过对 Wnt/ β -catenin 信号通路调控来抑制肿瘤的 EMT。FAT4 在 TNBC 中也很可能参与 EMT 的诱导发生,但目前相关具体机制与报道甚少。

FAT4 在 Hippo 信号通路中发挥上游促发因子的作用,该通路的作用靶点主要是下游蛋白 YAP, Hippo 通路的激活能够引起 YAP 蛋白的第 127 位丝氨酸残基磷酸化,使 YAP 与 14-3-3 蛋白结合停留在

细胞质;而阻断该通路可降低 YAP 磷酸化水平,未磷酸化的 YAP 能够顺利进入细胞核与转录因子 TEAD 结合,诱导细胞增殖与肿瘤产生^[21-22, 28-30]。因此 YAP 的磷酸化对能够降低细胞增殖、迁移的能力。该结果表明, FAT4 的表达水平与下游 YAP 的表达水平没有显著的相关性,但是 YAP 的磷酸化水平却显著降低,说明 FAT4 影响下游靶点 YAP 的磷酸化水平,可能通过该信号通路,调控 TNBC 细胞生物学行为的变化。Li 等^[31]在鼻咽癌顺铂耐药细胞中发现了 EMT 特性加强,细胞增殖和迁徙能力增强,而通过消耗 Hippo 信号通路下游逆转 EMT 表型,且恢复耐药细胞的治疗敏感性。但是 Hippo 信号通路在 TNBC 中的研究目前报道较少,该通路的验证,能为 TNBC 的基础研究拓展思路,为后期临床转归和甚至药物靶点设计指明了方向。

本研究发现,降低 FAT4 表达水平后 TNBC 细胞系 BT-549 和 MDA-MB-436 细胞增殖能力增强、凋亡能力减弱、侵袭迁移能力增强。FAT4 可能通过 Hippo 信号通路诱导 TNBC 细胞 EMT 的发生,影响肿瘤细胞侵袭迁移能力。说明 FAT4 可能对 TNBC 发生发展有重要影响,有可能成为早期诊断和治疗的候选基因。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.
- [2] Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment[J]. Cancer Discov, 2019, 9(2):176-198. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177.
- [3] Hou L, Chen M, Zhao X, et al. FAT4 functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37:16337-16343. doi: 10.1007/s13277-016-5421-3.
- [4] 陈茂山,莫琳龙,杨宏伟,等. FAT4 在三阴性乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(5):525-531. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.002.
Chen MS, Mo LL, Yang HW, et al. FAT4 expression in triple-negative breast cancer and its clinical significance[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(5): 525-531. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.002.
- [5] Li SY, Wang H, Mai HF, et al. Down-regulated long non-coding RNA RNAZFHX4-AS1 suppresses invasion and migration of breast cancer cells via FAT4-dependent Hippo signaling pathway[J]. Cancer Gene Ther, 2019, 26(11/12):374-387. doi: 10.1038/s41417-018-0066-6.

- [6] Che X, Jian F, Jia N, et al. FAT4-USP51 complex regulates the proliferation and invasion of endometrial cancer via Hippo pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5):2784–2800.
- [7] Malgundkar SH, Burney I, Al Moundhri M, et al. FAT4 silencing promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion via regulation of YAP and beta-catenin activity in ovarian cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):374. doi: 10.1186/s12885-020-06900-7.
- [8] Wang W, Huang Q, Chen Y, et al. The novel FAT4 activator jujuboside A suppresses NSCLC tumorigenesis by activating HIPPO signaling and inhibiting YAP nuclear translocation[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105723. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105723.
- [9] Medina MA, Oza G, Sharma A, et al. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 7(6):2078. doi: 10.3390/ijerph17062078.
- [10] Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances[J]. *F1000Res*, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-1342. doi: 10.12688/f1000research.18888.1.
- [11] Bareche Y, Buisseret L, Gruosso T, et al. Unraveling Triple-Negative Breast Cancer Tumor Microenvironment Heterogeneity: Towards an Optimized Treatment Approach[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 112(7):708–719. doi: 10.1093/jnci/djz208.
- [12] Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, et al. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153:104683. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104683.
- [13] Dees S, Ganesan R, Singh S, et al. Bispecific Antibodies for Triple Negative Breast Cancer[J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(2): 162–173. doi: 10.1016/j.trecan.2020.09.004.
- [14] Thakur C, Chen F. Connections between metabolism and epigenetics in cancers[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 57:52–58. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.06.006.
- [15] Intlekofer AM, Finley LWS. Metabolic signatures of cancer cells and stem cells[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(2): 177–188. doi: 10.1038/s42255-019-0032-0.
- [16] Ragni CV, Diguët N, Le Garrec JF, et al. Amotl1 mediates sequestration of the Hippo effector Yap1 downstream of Fat4 to restrict heart growth[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14582. doi: 10.1038/ncomms14582.
- [17] Feng X, Zhang C, Yang Y, et al. Role of miR-181a in the process of apoptosis of multiple malignant tumors: A literature review[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(2):263–270. doi: 10.17219/acem/66842.
- [18] Qiu B, Wang Q, Liu W, et al. Biological effects of trans fatty acids and their possible roles in the lipid rafts in apoptosis regulation[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(8):904–912. doi: 10.1002/cbin.10958.
- [19] Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer[J]. *Mol Cell*, 2020, 78(6): 1045–1054. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.014.
- [20] Ma L, Cui J, Xi H, et al. Fat4 suppression induces Yap translocation accounting for the promoted proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(1):36–47. doi: 10.1080/15384047.2015.1108488.
- [21] Li Z, Dong M, Fan D, et al. LncRNA ANCR down-regulation promotes TGF-beta-induced EMT and metastasis in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 67329–67343. doi: 10.18632/oncotarget.18622.
- [22] Zhang G, Huang P, Chen A, et al. How BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44?[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):20. doi: 10.1038/s41419-017-0037-0.
- [23] Fatima I, El-Ayachi I, Taotao L, et al. Correction: The natural compound Jatrophone interferes with Wnt/beta-catenin signaling and inhibits proliferation and EMT in human triple-negative breast cancer[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e197796. doi: 10.1371/journal.pone.0197796.
- [24] He Z, Dong W, Li Q, et al. Sauchinone prevents TGF-beta-induced EMT and metastasis in gastric cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 355–361. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.121.
- [25] Antognelli C, Cecchetti R, Riuzzi F, et al. Glyoxalase 1 sustains the metastatic phenotype of prostate cancer cells via EMT control[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5):2865–2883. doi: 10.1111/jcmm.13581.
- [26] Zhou W, Ye XL, Xu J, et al. The lncRNA H19 mediates breast cancer cell plasticity during EMT and MET plasticity by differentially sponging miR-200b/c and let-7b[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(483):eaak9557. doi: 10.1126/scisignal.aak9557.
- [27] Cai J, Feng D, Hu L, et al. FAT4 functions as a tumour suppressor in gastric cancer by modulating Wnt/beta-catenin signalling[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(12):1720–1729. doi: 10.1038/bjc.2015.367.
- [28] Khanal P, Jia Z, Yang X. Cysteine residues are essential for dimerization of Hippo pathway components YAP2L and TAZ[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3485. doi: 10.1038/s41598-018-21828-6.
- [29] Park JA, Kwon YG. Hippo-YAP/TAZ signaling in angiogenesis[J]. *BMBRep*, 2018, 51(3):157–162. doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.3.016.
- [30] Kuta A, Mao Y, Martin T, et al. Fat4-Dchs1 signalling controls cell proliferation in developing vertebrae[J]. *Development*, 2016, 143(13):2367–2375. doi: 10.1242/dev.131037.
- [31] Li S, Zhang X, Zhang R, et al. Hippo pathway contributes to cisplatin resistant-induced EMT in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(17): 1601–1610. doi: 10.1080/15384101.2017.1356508.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 蒲卢兰, 谢少利, 李金穗, 等. 三阴性乳腺癌细胞脂肪非典型钙黏蛋白4表达下调的生物学作用及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30(11): 1318–1326. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2021.11.007

Cite this article as: Pu LL, Xie SL, Li JS, et al. Biological actions of down-regulation of FAT atypical cadherin 4 in triple negative breast cancer cells and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2021, 30(11): 1318–1326. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.007