

# ECE2 通过上调 E2F1 和 MYC 来促进乳腺癌细胞的增殖和迁移

顾芯烨<sup>1</sup>, 吴旦平<sup>1</sup>, 江波<sup>1</sup>, 商江峰<sup>1</sup>, 蒋国勤<sup>2</sup>, 魏金荣<sup>2</sup>, 李华<sup>3</sup>

(1. 常熟市第一人民医院甲乳外科, 江苏常熟 215500; 2. 苏州大学附属第二医院普外科, 江苏苏州 215004; 3. 府谷县人民医院, 陕西榆林 719400)

**摘要:** **目的** 通过检测内皮素转化酶 2 (ECE2) 在乳腺癌中的表达, 探究其对乳腺癌细胞增殖、迁移的影响及潜在分子机制。**方法** 选取 20 例临床乳腺癌组织及其对应癌旁正常组织样本, 通过 qRT-PCR 检测 ECE2 基因在乳腺癌组织中的表达特征。通过 siRNA 介导敲低 ECE2 表达, 利用细胞增殖实验、克隆形成实验、划痕迁移实验和细胞周期实验分别验证敲低 ECE2 表达对乳腺癌细胞增殖、克隆形成、迁移及凋亡的影响。通过分析 ECE2 共表达基因参与的信号通路, 探索 ECE2 在乳腺癌发展进程中的潜在分子机制, 进一步通过细胞增殖回补实验进行验证。**结果** 20 例临床乳腺癌组织中 ECE2 表达较癌旁正常组织显著上调 ( $30.342 \pm 6.564$  vs  $21.753 \pm 8.244$ ), 差异有统计学意义 ( $t=3.645$ ,  $P=0.000$ )。转染敲低 ECE2 表达后, siECE2#1 组和 siECE2#2 组在 24, 48, 72 h 的吸光度值较对照组明显降低, 差异有统计学意义 ( $F=71.409 \sim 211.681$ , 均  $P < 0.01$ )。siECE2#1 组 ( $0.515 \pm 0.014$ ) 和 siECE2#2 组 ( $0.511 \pm 0.006$ ) 细胞克隆形成速率明显低于对照组 ( $3.473 \pm 0.147$ ), 差异有统计学意义 ( $F=467.152$ ,  $P < 0.001$ )。siECE2#1 组 ( $56.423 \pm 1.137$ ) 和 siECE2#2 组 ( $42.036 \pm 0.754$ ) 细胞迁移愈合速率显著低于对照组 ( $78.124 \pm 1.352$ ), 差异有统计学意义 ( $F=805.162$ ,  $P < 0.001$ )。siECE2#1 组和 siECE2#2 组细胞凋亡率较对照组明显降低, 细胞周期显著阻滞在 G1 期。siECE2#1 组和 siECE2#2 组细胞中 E2F1 mRNA 和蛋白表达水平明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ( $F=703.020, 136.301$ , 均  $P < 0.001$ ); MYC mRNA 和蛋白表达水平也明显低于对照组 ( $F=613.395, 102.573$ , 均  $P < 0.001$ )。在敲低 ECE2 表达的乳腺癌细胞中分别回补 E2F1 和 MYC 后, 细胞增殖速率回归至正常水平。**结论** ECE2 高表达诱导促癌基因 E2F1 和 MYC 的高表达进而促进乳腺癌细胞的增殖及迁移, 阻碍细胞周期停滞在 G1 期, 参与乳腺癌的发展进程。

**关键词:** 乳腺癌; 内皮素转化酶 2; E2F1; MYC; 增殖; 迁移

**中图分类号:** R737.9; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 04-039-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.009

## ECE2 Promotes Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells by Upregulation of E2F1 and MYC

GU Xin-ye<sup>1</sup>, WU Dan-ping<sup>1</sup>, JIANG Bo<sup>1</sup>, SHANG Jiang-feng<sup>1</sup>, JIANG Guo-qin<sup>2</sup>, WEI Jin-rong<sup>2</sup>, LI Hua<sup>3</sup>

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, the First People's Hospital of Changshu City, Jiangsu Changshu 215500, China; 2. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215004, China; 3. Fugu County People's Hospital, Shaanxi Yulin 719400, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of ECE2 in breast cancer and explore its effect on proliferation and migration of breast cancer cells and its potential molecular mechanism. **Methods** Twenty clinical breast cancer tissues and corresponding adjacent normal tissue samples were selected to detect the expression characteristics of ECE2 gene in breast cancer tissues by qRT-PCR. The effects of knockdown of ECE2 expression on proliferation, clone formation, migration and apoptosis of breast cancer cells were verified by cell proliferation assay, clone formation assay, scratch migration assay and cell cycle assay, respectively. The potential molecular mechanism of ECE2 in the development of breast cancer was explored by analyzing the signaling pathways involved in the genes co-expressed with ECE2, and further verified by cell proliferation and complement experiments. **Results** The expression of ECE2 in 20 clinical breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ( $30.342 \pm 6.564$  vs  $21.753 \pm 8.244$ ), the difference was statistically significant ( $t=3.645$ ,  $P=0.000$ ). After knockdown of ECE2 expression by transfection, the absorbance of SIEC2#1 and SIEC2#2 groups at 24, 48 and 72 h was significantly lower than that of

**基金项目:** 江苏省卫生计生委科研课题 (Z201951)。

**作者简介:** 顾芯烨 (1987-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 乳腺癌基础与临床研究, E-mail: g17416561@163.com。

**通讯作者:** 李华 (1973-), 女, 本科, 副主任技师, 研究方向: 临床检验, E-mail: 512954051@qq.com。

the control group, the difference was statistically significant ( $F=71.409\sim 211.681$ , all  $P<0.01$ ). The cell clone formation rate in SiECE2#1 group ( $0.515\pm 0.014$ ) and SiECE2#2 group ( $0.511\pm 0.006$ ) was significantly lower than that in control group ( $3.473\pm 0.147$ ), the difference was statistically significant ( $F=467.152$ ,  $P<0.001$ ). Cell migration and healing rate in SiECE2#1 group ( $56.423\pm 1.137$ ) and SiECE2#2 group ( $42.036\pm 0.754$ ) was significantly lower than that in control group ( $78.124\pm 1.352$ ), the difference was statistically significant ( $F=805.162$ ,  $P<0.001$ ). The apoptosis rate of SiECE2#1 and SiECE2#2 groups was significantly lower than that of the control group, and the cell cycle was significantly arrested in the G1 phase. The expression levels of E2F1 mRNA and protein in SiECE2#1 and SiECE2#2 groups were significantly lower than those in the control group, the difference were statistically significant ( $F=703.020$ ,  $136.301$ , all  $P<0.001$ ). MYC mRNA and protein expression levels were also significantly lower than those in the control group ( $F=613.395$ ,  $102.573$ , all  $P<0.001$ ). In breast cancer cells with knockdown ECE2 expression, the cell proliferation rate returned to normal after E2F1 and MYC were supplemented, respectively. **Conclusion** The high expression of ECE2 induces the high expression of oncogenes E2F1 and MYC, which further promotes the proliferation and migration of breast cancer cells, hindering the cell cycle stagnation in G1 phase and participating in the development of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; ECE2; E2F1; MYC; proliferation; migration

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率占全身各种恶性肿瘤的7%~10%,以手术为主的综合疗法是其临床主要治疗方法<sup>[1-2]</sup>。近年研究发现,乳腺癌是由上皮细胞恶性转化形成,在此过程中多种基因蛋白及信号通路参与其中<sup>[3]</sup>。越来越多证据也表明,肿瘤的发生和发展与基因或蛋白的异常表达有关,多种基因或蛋白可在表观遗传学层面调控基因的表达,参与肿瘤的发生进程<sup>[4]</sup>。并指出人类恶性肿瘤中存在多种基因或蛋白异常表达,可调控癌细胞的生物学行为及转录激活/抑制,与临床病理及预后关系密切<sup>[5]</sup>。目前,基于分子生物学探究肿瘤发生发展的分子机制是近年肿瘤研究领域的热点,也为临床肿瘤的研究治疗提供了新的方向。故深入探究找寻新的生物分子标志物并探究其在乳腺癌中的作用,对乳腺癌的临床诊治及预测预后具有积极意义。内皮素转化酶(ECE)是II型膜金属肽酶,因其具有将无活性的前体大内皮素转化为有效的血管活性肽内皮素1的能力而命名<sup>[6]</sup>。ECE1和ECE2具有59%的序列同源性并切割相似的底物,其中ECE1在中性pH下最活跃,ECE2在弱酸性pH下最活跃<sup>[7]</sup>。目前,ECE2在癌症中的研究报道鲜少,而本研究前期经检索GEPIA<sup>[8]</sup>临床数据库筛选乳腺癌特异性靶基因时发现ECE2基因在乳腺癌中表达异常,与乳腺癌临床病理分级及预后关系密切,提示其在乳腺癌发生发展中可能扮演某种角色发挥重要作用。因此,本研究拟通过设计体外细胞试验探究ECE2在乳腺癌中表达及对乳腺癌细胞增殖、克隆形成、迁移和细胞周期的影响和潜在分子机制,以期临床靶标的筛选提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2018年9月~2019年9月于常熟市第一人民医院行手术治疗的20例乳腺癌患者肿瘤组织及其癌旁正常组织(距癌灶边缘>5cm)标本,所有组织均由手术获取,快速行冰

冻病理检查确认后低温保存备用。人乳腺癌细胞系MCF7购于中国科学院细胞库,放入含10ml/dl胎牛血清的DMEM培养液培养,加入链霉素100 μg/ml和青霉素100 IU/ml,37℃,5ml/dl CO<sub>2</sub>培养箱培养。

**1.2 仪器及试剂** 胎牛血清购自上海薇宏生物科技有限公司;DMEM培养液购自美国Hyclone公司;MTS试剂购自南京凯基生物技术有限公司;酶标仪购自美国赛默飞公司;Annexin V-PI细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Lipo2000购自美国Invitrogen公司等。

## 1.3 方法

**1.3.1 细胞转染:**待密度达到80%左右进行细胞转染,参照Lipo2000说明书进行,转染后37℃,5ml/dl CO<sub>2</sub>,95%湿度条件下常规培养2天,收集细胞用于后续实验。转染分组:转染无义SiCTL序列的细胞作为对照组(SiCTL组),转染2条ECE2 SiRNA序列细胞分别作为SiECE2#1组和SiECE2#2组。

**1.3.2 细胞增殖实验:**取消化后细胞以适当浓度铺于96孔板,每组设3个复孔;37℃,5ml/dl CO<sub>2</sub>孵育待细胞贴壁后进行转染,48 h后测量吸光度。按照MTS:培养液=1:20比例配制MTS反应液,每孔加入MTS反应液100 μl,37℃分别继续培养0,24,48和72 h后在490 nm处测量各孔的吸光度值,绘制细胞增殖曲线。

**1.3.3 克隆形成实验:**取转染后各组细胞适当浓度铺于6孔板,每孔设3个复孔,培养6~14天待出现肉眼可见的克隆时收集细胞,PBS洗涤两次,0.5g/dl结晶紫甲醇溶液固定15 min,水洗、晾干、扫描、10g/dl醋酸溶液溶解结晶紫,在590 nm处测吸光度值。

**1.3.4 划痕迁移实验:**取消化后细胞铺于6孔板,细胞贴壁后进行转染,待生长到90%用枪头在孔板中央划痕,PBS冲洗,培养0,24 h拍摄照片观察。

**1.3.5 细胞周期实验:**取消化后细胞重悬于PBS

溶液,吹散、滴加等体积预冷无水乙醇,振荡混匀,4℃静置12~24h,3000g离心3min,弃上清,重复一次;加入500μl PI/Triton X-100 染液 [Triton X-100(0.10%)5μl, DNA Sefree RNA see A(sigma)2mg, PI(40μg/ml)10μl, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 500μl] 37℃孵育15min,行DNA染色,过滤成簇细胞,避光保存上机实验分析。

1.3.6 基因功能分析:在cBioPortal<sup>[9]</sup>临床数据库中找到与ECE2共表达(相关性 $r>0.4$ )的基因,后拷贝在metascape数据库中进行Hallmark和KEGG信号通路分析。

1.3.7 细胞增殖回补实验:取消化后细胞铺于96孔板,37℃,5ml/dl CO<sub>2</sub> 孵育待细胞贴壁后进行转染siCTL, siECE2, siECE2+E2F1和siECE2+MYC,每孔设3个复孔;每孔加入MTS反应液100μl,继续培养,在490nm处测量吸光度值,绘制细胞增殖曲线。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行实验结果分析,所有实验数据均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间采用one-way ANOVA分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;乳腺癌组织及临近正常组织数据比较采用配对*t*检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

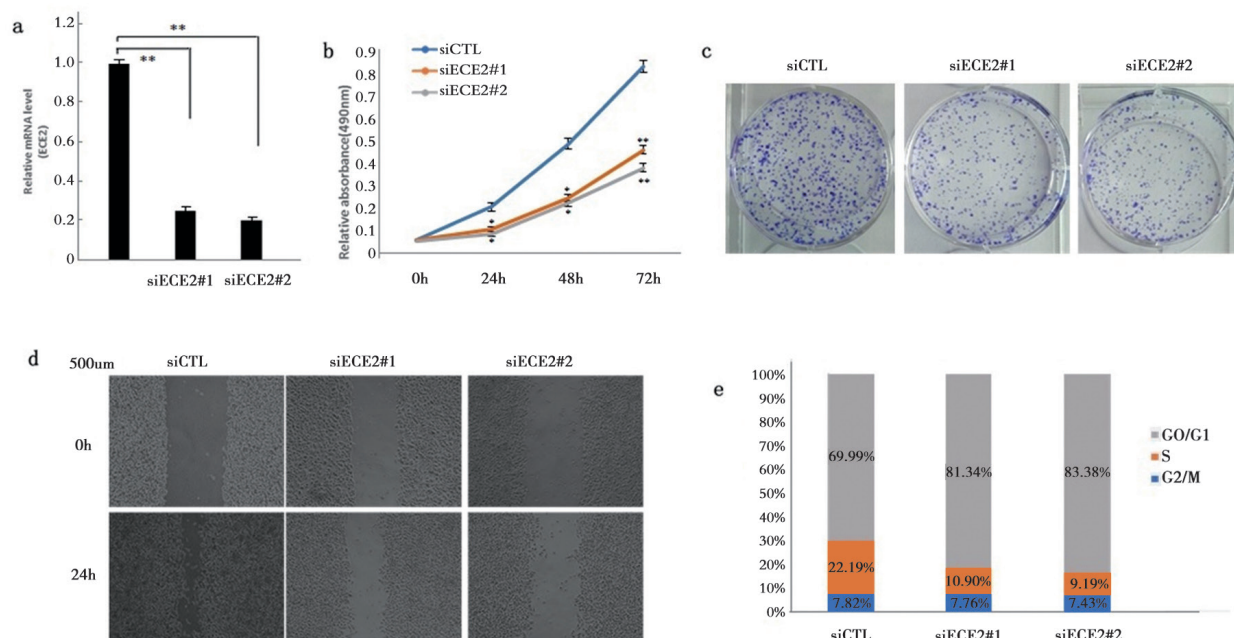
## 2 结果

2.1 ECE2在乳腺癌组织中的表达 采用qRT-PCR法检测20例临床乳腺癌组织样本,发现乳腺癌组织中ECE2表达量( $30.342 \pm 6.564$ )显著高于癌旁组

织( $21.753 \pm 8.244$ ),差异有统计学意义( $t=7.484$ ,  $P < 0.001$ )。

2.2 敲低ECE2对乳腺癌细胞增殖、克隆形成、迁移及细胞周期的影响 敲低ECE2显著抑制乳腺癌细胞增殖、克隆形成和迁移,阻滞细胞周期在G1期。通过靶向转染敲低乳腺癌中ECE2表达,见图1a。经检测发现siECE2#1组( $0.232 \pm 0.016$ )和siECE2#2组( $0.214 \pm 0.014$ )细胞中ECE2 mRNA表达明显低于对照组( $1.000 \pm 0.010$ ),差异有统计学意义( $F=756.347$ ,  $P < 0.001$ ),提示成功转染敲低ECE2表达。

细胞增殖实验见表1,图1b。转染24,48和72h后,对照组、siECE2#1组、siECE2#2组在490nm处的吸光度值差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。克隆形成实验见图1c。siECE2#1组( $0.515 \pm 0.014$ )和siECE2#2组( $0.511 \pm 0.006$ )细胞克隆形成速率显著低于对照组( $3.473 \pm 0.147$ ),差异有统计学意义( $F=467.152$ ,  $P < 0.001$ )。划痕迁移实验见图1d。siECE2#1组( $56.423 \pm 1.137$ )和siECE2#2组( $42.036 \pm 0.754$ )细胞迁移愈合速率显著低于对照组( $78.124 \pm 1.352$ ),差异有统计学意义( $F=805.162$ ,  $P < 0.001$ )。细胞周期实验见图1e。与对照组(69.99%)相比,siECE2#1组(81.34%)和siECE2#2组(83.38%)细胞周期显著阻滞在G1期,以上结果说明ECE2在乳腺癌发展进程中发挥促癌作用。



注: a. siRNA 介导敲低 ECE2 的转染验证, \*\* $P < 0.01$ ; b. 细胞增殖实验验证敲低 ECE2 表达对细胞增殖的影响, 与 siCTL 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; c. 克隆形成实验验证敲低 ECE2 表达对细胞克隆形成速率的影响; d. 划痕迁移实验验证敲低 ECE2 表达对细胞迁移的影响; e. 细胞周期实验验证敲低 ECE2 表达对细胞周期的影响。

图1 敲低ECE2对乳腺癌MCF7细胞增殖、克隆形成、迁移及细胞周期的影响



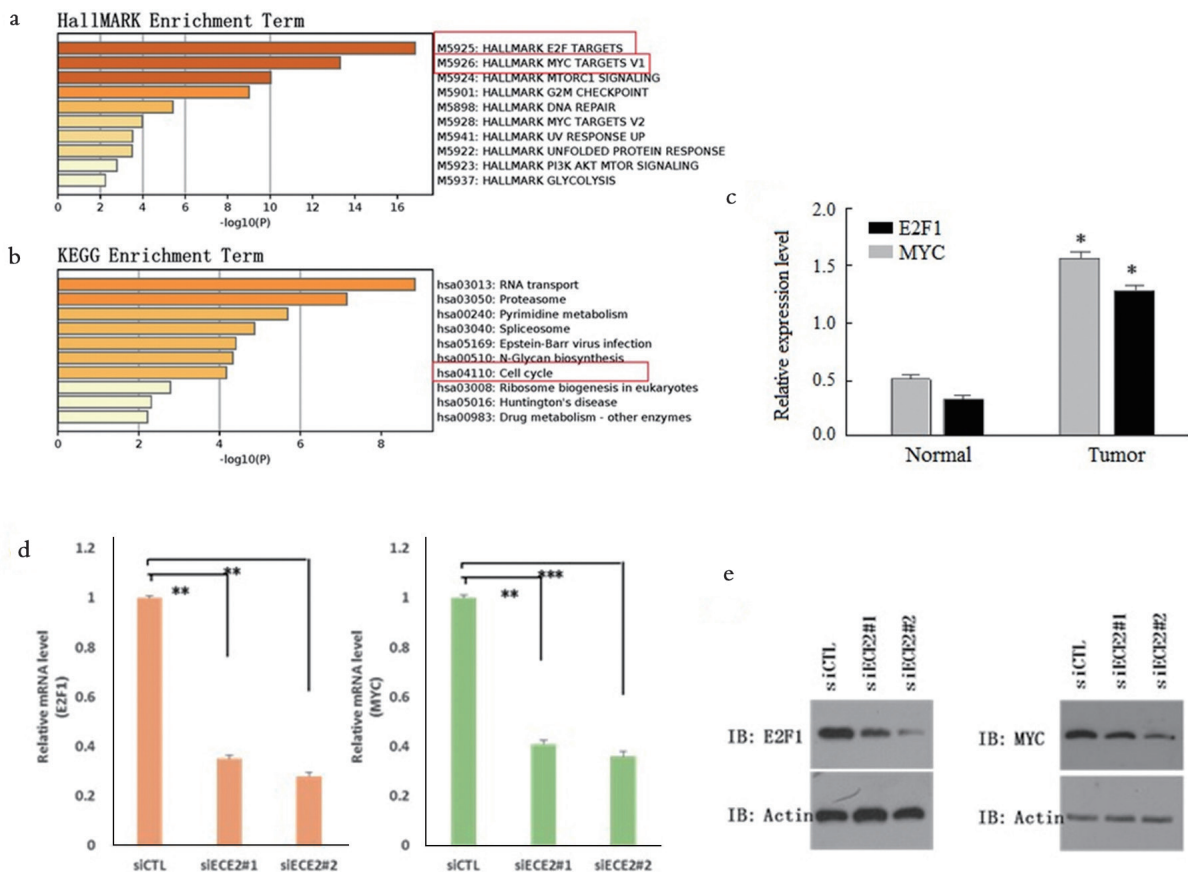
2.3 ECE2 正调控 E2F1 和 MYC 表达 通过 metascape 数据库分析与 ECE2 共表达的基因, Hallmark 信号通路显示 ECE2 促进乳腺癌的生长可能是因其影响 E2F1 和 MYC 表达 ( $P < 10^{-2}$ ), 见图 2a。同时 KEGG 信号通路也发现 ECE2 可显著影响细胞周期 ( $P < 10^{-4}$ , 见图 2b)。经检测 20 例临床组织样本, 发现乳腺癌组织中 E2F1 ( $1.534 \pm 0.316$ ) 和 MYC ( $1.323 \pm 0.214$ ) 表达水平显著高于癌旁组织样本 ( $0.542 \pm 0.125$  和  $0.347 \pm 0.239$ ), 差异均有统计学意义 ( $t=13.055, 13.606$ , 均  $P < 0.001$ ), 见图 2c。qRT-PCR 检测显示, siECE2#1 组 ( $0.373 \pm 0.018$ ) 和 siECE2# 组 ( $0.352 \pm 0.015$ ) 细胞中 E2F1 mRNA 表达水平明显低于对照组 ( $1.012 \pm 0.013$ ), 差异有统计学意义 ( $F=703.020, P < 0.001$ ); siECE2#1

组 ( $0.415 \pm 0.017$ ) 和 siECE2# 组 ( $0.396 \pm 0.016$ ) 中 MYC mRNA 表达水平也明显低于对照组 ( $1.014 \pm 0.012$ ), 差异有统计学意义 ( $F=613.395, P < 0.001$ ), 见图 2d。蛋白免疫印迹实验检测显示: siECE2#1 组 ( $0.485 \pm 0.044$ ) 和 siECE2# 组 ( $0.287 \pm 0.035$ ) 细胞中 E2F1 蛋白表达低于对照组 ( $1.057 \pm 0.086$ ), 差异有统计学意义 ( $F=136.301, P < 0.001$ ); siECE2#1 组 ( $0.557 \pm 0.048$ ) 和 siECE2# 组 ( $0.557 \pm 0.048$ ) 细胞中 MYC 蛋白也显著低于对照组 ( $1.048 \pm 0.079$ ), 差异有统计学意义 ( $F=102.573, P < 0.001$ ), 见图 2e。提示 ECE2 可正向调控 E2F1, MYC 表达, 其可能通过调控 E2F1, MYC 表达进而促进乳腺癌发生发展。

表 1 不同时间点各组细胞吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

时 间 (h)	siCTL 组①	siECE2#1 组②	siECE2#2 组③	F	P
24	0.203 ± 0.019	0.092 ± 0.011	0.083 ± 0.009	71.409	<0.001
48	0.482 ± 0.023	0.224 ± 0.017	0.219 ± 0.012	211.681	<0.001
72	0.824 ± 0.026	0.456 ± 0.020	0.376 ± 0.019	357.545	<0.001

注: 各时间点①组与②③组比较, 差异有统计学意义  $P < 0.05$ ; ②③组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



注: a-b. 通过 metascape 数据库筛选与 ECE2 共表达的基因; c. 20 例临床乳腺癌及癌旁组织中 E2F1, MYC mRNA 表达, \* $P < 0.05$ ; d. qRT-PCR 实验验证敲低 ECE2 表达对 E2F1, MYC mRNA 表达水平的调控, 与 siCTL 组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; e. 蛋白免疫印迹实验验证敲低 ECE2 表达对 E2F1, MYC 蛋白表达的调控。

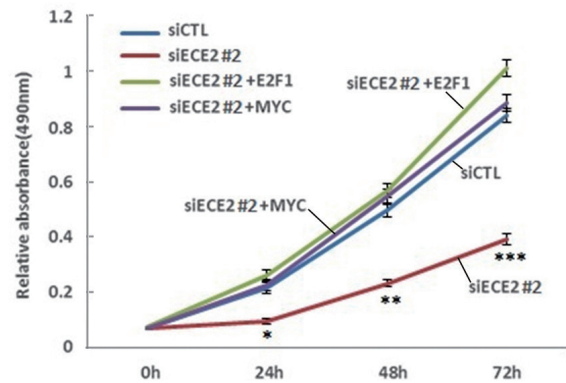
图 2 ECE2 调控乳腺癌发生发展的作用验证

2.4 ECE2 通过上调 E2F1 和 MYC 表达促进乳腺癌生长 研究在敲低 ECE2 表达效果显著的 siECE2#2 组细胞中分别回补 E2F1 和 MYC, 发现在敲低 ECE2 表达的细胞中重新过表达 E2F1 和 MYC 后, 细胞增殖速率又回归正常水平, 见图 3。各组吸光度值见表 2。进一步说明 ECE2 主要通过促进 E2F1 和 MYC 的表达从而促进乳腺癌的发展进程。

### 3 讨论

研究前期为找寻乳腺癌新的分子靶基因, 通过 GEPIA 数据库筛选发现相比于 291 个邻近正常组织, 有 1 085 个乳腺癌组织中 ECE2 显著高表达, 且发现随着乳腺癌临床分期越高癌组织中 ECE2 表达水平越高, 与乳腺癌恶性程度呈正相关; ECE2 高表达乳腺癌患者五年预后生存率为 73.5%, 明显低于其低表达患者的 94.8% (Logrank  $P=0.0053$ ), 提示 ECE2 基因高表达在乳腺癌发生发展中应扮演某种重要角色。既往研究发现, ECE2 主要在神经组织中表达, 主要在锥体神经元中被检测到, 星形胶质细胞和小胶质细胞中也有少量表达<sup>[6]</sup>。ECE2 四个亚型都位于细胞内分泌囊泡中, 均能够在轻度酸性条件下降解细胞内神经肽<sup>[7]</sup>。ECE2 基因编码变异可用于识别阿尔茨海默病<sup>[10]</sup>。ECE2 在人类皮层发育过程中调节神经发生和神经元迁移<sup>[11]</sup>。而目前关于 ECE2 的表达和功能研究较少, 其在乳腺癌中的表达作用尚不明确, 故进一步探究其对乳腺癌细胞生物学行为的影响对临床乳腺癌的研究具有重要意义。本研究经检测 20 组乳腺癌临床组织

样本中 ECE2 表达, 发现既往数据库结果一致均显著高于正常组织, 暗示 ECE2 在乳腺癌发生发展进程中发挥致癌基因属性。根据 ECE2 的临床特征研究探究了其在乳腺癌中的功能及其分子机制, 转染 siRNA 介导敲低乳腺癌 MCF7 细胞中 ECE2 表达, 经体外细胞增殖实验、克隆形成实验、划痕迁移实验及细胞周期实验探究发现, 敲低 ECE2 表达后 MCF7 细胞增殖率、克隆形成速率及细胞迁移速率均显著减慢, 促使细胞周期显著阻滞在 G1 期, 证实了 ECE2 高表达的致癌性; 接着研究利用与 ECE2 共表达基因参与的信号通路发现 ECE2 可调控促癌基因 E2F1 和 MYC 的表达, 故进一步探究了其 E2F1 和 MYC 基因间的相互调控作用。



注: 在敲低 ECE2 表达细胞中分别回补 E2F1 和 MYC 后对细胞增殖速率的影响, 分别与 siCTL 组、siECE2#2+E2F1 组和 siECE2#2+MYC 组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图 3 回补实验验证

时间 (h)	siCTL ①	siECE2#2 ②	siECE2#2+E2F1 ③	siECE2#2+MYC ④	F	P
24	0.203 ± 0.019	0.083 ± 0.009	0.247 ± 0.022	0.213 ± 0.019	47.699	<0.001
48	0.482 ± 0.023	0.219 ± 0.012	0.554 ± 0.025	0.532 ± 0.026	145.659	<0.001
72	0.824 ± 0.026	0.376 ± 0.019	0.933 ± 0.029	0.867 ± 0.030	277.221	<0.001

注: 24, 48, 72 h 时, ②组分别与①③④组相比, 均  $P<0.05$ ; 各时间点①③④组差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

目前, 已在哺乳动物细胞中鉴定出 8 种 E2F 因子, 并按其发现顺序编号为 E2F1-8<sup>[12]</sup>。在人类乳腺癌中, E2F 被认为具有复杂的作用。据报道, E2F1 表达上调参与了乳腺癌的癌变, 其结果是参与了 Nanog 表达的抑制<sup>[13]</sup>。LIU 等<sup>[14]</sup>报道, 转录因子 E2F1 与 HBXIP 共表达发挥激活作用, 诱导 PKM2 表达, 进而促进雌激素受体阳性 (ER+) 乳腺癌细胞的增殖。抑制 E2F1 可抑制 MCF7 细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[15]</sup>; E2F1 及其与组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 的复合物在下调乳腺癌细胞中抑癌基因 ARHI 的表达中起重要作用<sup>[16]</sup>, 表示 E2F1 在乳腺癌中发挥致癌作用, 与以上报道一致的是, 本研究发现敲低 ECE2 在乳腺癌细胞中的表达后, E2F1

表达显著降低, 导致乳腺癌细胞生长增殖速率减慢; 但在敲低 ECE2 表达的乳腺癌细胞中回补 E2F1, 细胞增殖速率又回归正常水平, 说明 ECE2 促进乳腺癌进程主要通过调控 E2F1 来实现。

原癌基因 c-MYC 控制细胞增殖与细胞死亡之间的平衡<sup>[17]</sup>。致癌基因 c-MYC 通过蛋白质的基本螺旋与 Max 蛋白形成异源二聚体, 调节靶基因的转录活性, 包括代谢酶和细胞周期调节剂, 如细胞周期蛋白 D2<sup>[18]</sup>。此外, c-Myc 的表达上调会影响肿瘤发生, 例如 c-Myc 过度表达与乳腺癌, NSCLC 和前列腺癌有关<sup>[19-21]</sup>。本研究发现敲低 ECE2 表达后乳腺癌细胞中 MYC 表达也显著降低, 导致乳腺癌细胞生长增殖速率减慢, 但在敲低 ECE2 表达的

乳腺癌细胞中回补 MYC, 细胞增殖速率又回归正常水平, 进一步说明了 ECE2 促进乳腺癌进程也可通过调控 MYC 来实现。然而肿瘤的发生发展是多基因、多通路共同作用的结果, 癌基因参与调控肿瘤进程的分子机制复杂, 故 ECE2 在乳腺癌中的表达调控作用机制还需通过更深入的信号分子通路进一步研究探明。

综上所述, ECE2 在乳腺癌中高表达导致促癌靶基因 E2F1 和 MYC 显著高表达, 从而促进乳腺癌细胞生长增殖、克隆形成和迁移, 并缩短细胞周期 G1 进程, 从而导致乳腺癌的发生发展。

#### 参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J. Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 周晓艳, 李越, 何谦, 等. Prohibitin 表达及对乳腺癌细胞系 MCF-7 抑制生长的机制研究[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(3):6-10, 19.  
ZHOU Xiaoyan, LI Yue, HE Qian, et al. Expression of prohibitin and its restrain mechanism to growth in the breast cancer cell MCF-7[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(3):6-10, 19.
- [3] 赵晶, 吴楠, 张世超, 等. 乳腺癌靶向治疗新进展[J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(5):353-361.  
ZHAO Jing, WU Nan, ZHANG Shichao, et al. New advances in targeted therapy for breast cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2020, 42(5):353-361.
- [4] 张鑫浩, 张涛元, 李俏, 等. 基于 GEO 芯片数据的肝癌关键生物标志物的筛选与鉴定及生物信息学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4):26-31.  
ZHANG Xinhao, ZHANG Taoyuan, LI Qiao, et al. Screening, identification and bioinformatics analysis of key biomarkers for *Hepatocellular carcinoma* based on GEO chip data[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4):26-31.
- [5] 张百红, 岳红云. 肿瘤新特征研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(11):2009-2013.  
ZHANG Baihong, YUE Hongyun. Hallmarks of cancer: The new decade[J]. Modern Oncology, 2011, 29(11):2009-2013.
- [6] TAPIA J C, NIECHI I. Endothelin-converting enzyme-1 in cancer aggressiveness[J]. Cancer Letters, 2019, 452:152-157.
- [7] HEYMAN S N, ABASSI Z, ROSENBERGER C, et al. Cyclosporine A induces endothelin-converting enzyme (ECE)-1: studies in-vivo and in-vitro[J]. Acta Physiologica, 2018, 223(1):e13033.
- [8] 郭安源. 基因转录表达数据的生物信息挖掘研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(1):70-82.  
GUO Anyuan. Bioinformatics mining for gene expression data[J]. Science in China: Life Sciences, 2021, 51(1):70-82.
- [9] WU P, HEINS Z J, MULLER J T, et al. Integration and analysis of CPTAC proteomics data in the context of cancer genomics in the cBioPortal[J]. Mol Cell Proteomics, 2019, 18(9):1893-1898.
- [10] BUCHSBAUM I Y, KIELKOWSKI P, GIORGIO G, et al. ECE2 regulates neurogenesis and neuronal migration during human cortical development[J]. EMBO Reports, 2020, 21(5):e48204.
- [11] LIAO Xinxin, CAI Fang, SUN Zhanfang, et al. Identification of Alzheimer's disease-associated rare coding variants in the ECE2 gene[J]. JCI Insight, 2020, 5(4):e135119.
- [12] SHEN Yong, NAR R, FAN A X, et al. Functional interrelationship between TFII-I and E2F transcription factors at specific cell cycle gene loci[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):712-722.
- [13] LU Guanming, LI Yueyong, MA Yanfei, et al. Long noncoding RNA LINC00511 contributes to breast cancer tumour genesis and stemness by inducing the miR-185-3p/E2F1/Nanog axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):289.
- [14] LIU Bowen, WANG Tianjiao, LI Leilei, et al. Oncoprotein HBXIP induces PKM2 via transcription factor E2F1 to promote cell proliferation in ER-positive breast cancer[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(4):530-538.
- [15] 沈诚, 李珏, 常帅, 等. E2F1 在常见肿瘤中的最新研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(10):921-926.  
SHEN Cheng, LI Jue, CHANG Shuai, et al. Advancement of E2F1 in common tumors[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2020, 23(10):921-926.
- [16] SUTTON M N, HUANG G Y, ZHOU Jinhua, et al. Abstract 1325: DIRAS3 (ARHI) is required for amino acid-mediated autophagy and nutrient deprivation in dormant ovarian cancers[J]. Cancer Research, 2018, 78(13 suppl):1325.
- [17] WANG Chen, ZHANG Jiawei, YIN Jie, et al. Alternative approaches to target Myc for cancer treatment[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1):117.
- [18] CINZIA C, MARCO P, VALENTINA P, et al. c-MYC empowers transcription and productive splicing of the oncogenic splicing factor Sam68 in cancer[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(12):6160-6171.
- [19] ZHOU Yu, GENG Yan, ZHANG Yujiao, et al. The requirement for cyclin E in c-Myc overexpressing breast cancers[J]. Cell Cycle, 2020, 19(20):2589-2599.
- [20] LI H S, LÜ R Q, LIU L. Correlation of CT indicators of NSCLC and pathological features and the expression level of p53 and c-myc[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(1):135-141.
- [21] SHENG Xia, NENSETH H Z, QU Su, et al. IRE1  $\alpha$ -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling[J]. Nature Communications, 2019, 10(1):323.

收稿日期: 2021-01-20

修回日期: 2021-06-08