

TMEM16A 在乳腺癌中的表达及其对 MCF-7 细胞增殖、侵袭和 MAPK 信号通路的影响

赵永胜 周 锐 张 娟 马小茶 师卫华

银川市第一人民医院 宁夏 银川 750001

【摘 要】目的：探讨跨膜蛋白 16A (TMEM16A/ANO1) 在乳腺癌中的表达及其对癌细胞增殖、周期、凋亡、侵袭及体内成瘤的影响。方法：收集 20 例乳腺癌及配对癌旁组织检测 TMEM16A 表达；MCF-7 细胞中敲低 TMEM16A 后检测增殖、周期、凋亡与侵袭；裸鼠移植瘤模型观察体内成瘤并检测 MAPK 通路蛋白及 Cyclin D1。结果：乳腺癌组织中 TMEM16A mRNA 和蛋白均高表达 ($P<0.01$)。敲低 TMEM16A 可抑制 MCF-7 细胞增殖、诱导 G0/G1 期阻滞、削弱侵袭 ($P<0.01$)，对凋亡影响不明显；移植瘤生长明显减缓 ($P<0.05$)，伴 p-p38、p-ERK1/2 及 Cyclin D1 下调，总蛋白无明显变化。结论：TMEM16A 在乳腺癌中高表达，敲低后可能经 p38/ERK1/2-Cyclin D1 轴抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及体内成瘤，是潜在治疗靶点。

【关键词】乳腺癌；TMEM16A；细胞周期；细胞侵袭；MAPK 信号通路；Cyclin D1

DOI:10.12417/2811-051X.26.12.007

1 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，复发、转移和治疗耐受仍是影响患者长期生存的主要因素^[1-2]，鉴定驱动其进展的关键分子意义重大。跨膜蛋白 16A (TMEM16A，又称 ANO1) 属钙激活氯离子通道家族，位于 11q13 扩增区，在乳腺癌等多种肿瘤中高表达并与增殖、侵袭及预后相关^[3-6]。TMEM16A 可激活 EGFR、CaMK 信号并与 EGFR/STAT3 形成相互激活环路^[4,9]，亦可经 MAPK/Cyclin D1 轴调控肿瘤增殖^[7]，但其对周期、凋亡及侵袭的具体作用尚待验证。本研究检测 TMEM16A 在乳腺癌组织中的表达，并观察敲低 TMEM16A 对 MCF-7 细胞增殖、周期、凋亡、侵袭及体内成瘤的影响与机制。

2 材料与方法

(1) 临床标本：收集 20 例乳腺癌患者癌组织及配对癌旁组织，液氮速冻后 -80℃ 保存，均经病理确诊。研究经伦理委员会批准并取得患者知情同意。(2) 细胞培养与转染：MCF-7 细胞以含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基，于 37℃、5% CO₂ 培养。设 Control 组（未转染）、NC 组（阴性对照）和 siRNA 组（TMEM16A 特异性 siRNA），转染 48 h 后进行后续实验。(3) qPCR：提取组织及细胞总 RNA 并反转录，以 GAPDH 为内参行 qPCR，相对表达量以 2^{-ΔΔCt} 法计算^[10-11]，每组重复 ≥ 3 次。(4) Western blot：BCA 法定量总蛋白，经 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭后孵育相应一抗 (TMEM16A、p-p38、p38、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK、Cyclin D1 及 GAPDH)，化学发光显影。(5) MTT 实验：转染后细胞接种 96 孔板，于 0、24、48、72、96 h 测 490 nm 吸光度评估细胞活力^[12]。(6) 流式细胞术：PI 染色检测细胞周

期分布；Annexin V-FITC/PI 双染检测凋亡率^[13]。(7) Transwell 侵袭实验：采用基质胶预包被的 Transwell 小室^[14]，细胞培养 12~24 h 后结晶紫染色计数穿膜细胞。(8) 裸鼠移植瘤实验：稳定敲低 TMEM16A 的 MCF-7 细胞接种于裸鼠皮下，定期测量计算肿瘤体积，终点剥离瘤体。动物实验经伦理委员会批准。(9) 统计学分析：计量资料以均数 ± 标准差表示，两组比较用 t 检验，多组比较用单因素方差分析， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TMEM16A 在乳腺癌中高表达及敲低模型验证

qPCR 显示乳腺癌组织中 TMEM16A mRNA 显著高于癌旁组织 ($P<0.01$)，Western blot 在 4 对组织中证实蛋白同步升高；转染 si-TMEM16A 后 mRNA 和蛋白均明显降低 ($P<0.01$)，敲低模型构建成功 (图 1)。

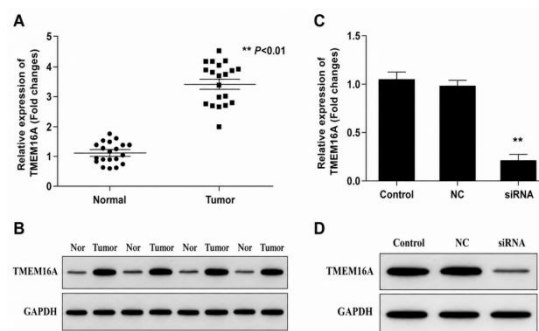


图 1 TMEM16A 在乳腺癌组织中高表达及敲低效率验证

A: qPCR 检测癌及癌旁组织 TMEM16A mRNA; B: Western blot 检测 4 对组织 TMEM16A 蛋白; C、D: qPCR 和 Western blot

验证敲低效率。 $**P<0.01$ 。

3.2 敲低 TMEM16A 抑制细胞增殖并诱导 G0/G1 期阻滞

MTT 显示自 48 h 起 siRNA 组细胞活力显著低于对照组 ($P<0.05$)；流式细胞术显示敲低组 G0/G1 期比例升高、S 期比例降低，提示敲低 TMEM16A 通过 G0/G1 期阻滞抑制增殖 (图 2)。

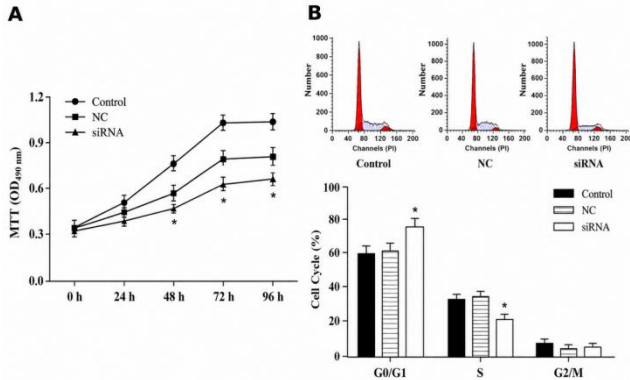


图2 敲低 TMEM16A 抑制 MCF-7 细胞增殖并诱导细胞周期阻滞

A: MTT 检测各组细胞活力；B: 流式细胞术检测细胞周期分布。 $*P<0.05$ 。

3.3 敲低 TMEM16A 对凋亡影响不明显但显著抑制侵袭

双染显示敲低组凋亡率仅轻度升高，差异不明显；Transwell 穿膜细胞数显著减少 ($P<0.01$)，提示敲低 TMEM16A 主要抑制增殖与侵袭而非诱导凋亡 (图 3)。

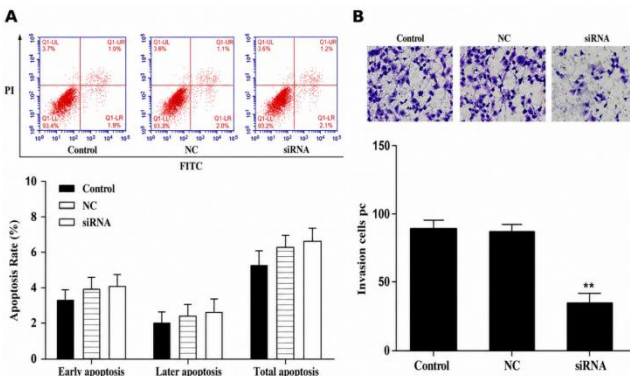


图3 敲低 TMEM16A 对 MCF-7 细胞凋亡及侵袭能力的影响。A: Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡；B: Transwell 检测细胞侵袭能力。 $**P<0.01$ 。

3.4 敲低 TMEM16A 抑制体内成瘤并下调 MAPK/Cyclin D1 信号

裸鼠移植瘤实验显示敲低组肿瘤生长减慢，后期体积显著小于 Control 组 ($P<0.05$)，p-p38、p-ERK1/2 及 Cyclin D1 表

达降低，总 p38、ERK1/2、p-JNK、JNK 无明显变化，提示 TMEM16A 经 p38/ERK1/2-Cyclin D1 轴调控乳腺癌生长 (图 4)。

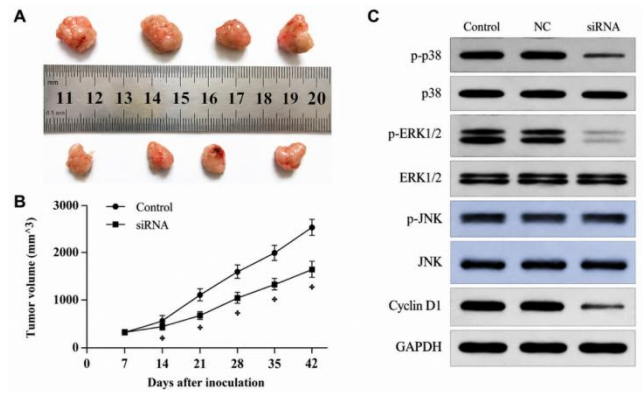


图4 敲低 TMEM16A 抑制体内生长并调控 MAPK/Cyclin D1 信号

A: 移植瘤大体图；B: 体积生长曲线；C: Western blot 检测 MAPK 通路蛋白及 Cyclin D1。 $*P<0.05$ 。

4 讨论

本研究证实 TMEM16A 在乳腺癌中高表达，敲低后可抑制 MCF-7 细胞增殖与侵袭、诱导 G0/G1 期阻滞并抑制体内成瘤，伴 p38/ERK1/2 磷酸化及 Cyclin D1 下调。TMEM16A 最初被鉴定为钙激活氯离子通道^[3]，近年研究揭示其超越离子通道功能的促癌作用^[4-6]，本研究结果与既往报道一致^[4-5]。

Cyclin D1 是 G1/S 期转换的关键调控因子。本研究敲低 TMEM16A 后细胞活力下降、G0/G1 期比例升高并伴 Cyclin D1 下调，与 Deng 等^[7]的结果一致，提示 TMEM16A 可能通过维持 Cyclin D1 表达推动周期进程。敲低 TMEM16A 并未显著诱导凋亡，说明其抑制细胞活力主要通过阻滞细胞周期实现，对不同分子亚型凋亡调控的作用仍需救援实验验证^[6,9]。

敲低 TMEM16A 显著减少穿膜细胞数，提示其参与细胞运动与基质穿透，可能与 EGFR、MAPK、CaMK 及细胞骨架通路有关^[4-6,9]，后续可检测 EMT 标志物及 MMPs。敲低后仅 p38 和 ERK1/2 磷酸化降低而总蛋白稳定，结合 Cyclin D1 下调，提示 TMEM16A 主要通过 p38/ERK1/2-Cyclin D1 轴促进乳腺癌增殖与体内生长。

本研究的局限：样本量较小，未结合分子分型及预后资料；体外仅用 MCF-7 细胞，缺乏过表达及救援实验；通道活性的作用有待膜片钳等技术阐明。

5 结论

TMEM16A 在乳腺癌组织中显著高表达，敲低后可抑制 p38/ERK1/2 MAPK 信号活化并下调 Cyclin D1，进而抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭及体内成瘤，有望成为潜在治疗靶点。

参考文献:

- [1] Giaquinto A N,Sung H,Newman L A,et al.Breast cancer statistics 2024[J].CA Cancer J Clin,2024,74(6):477-495.
- [2] Bray F,Laversanne M,Sung H,et al.Global cancer statistics 2022:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA Cancer J Clin,2024,74(3):229-263.
- [3] Caputo A,Caci E,Ferrera L,et al.TMEM16A,a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity[J].Science,2008,322(5901):590-594.
- [4] Britschgi A,Bill A,Brinkhaus H,et al.Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2013,110(11):E1026-E1034.
- [5] Duvvuri U,Shiwarski D J,Xiao D,et al.TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression[J].Cancer Res,2012,72(13):3270-3281.
- [6] Guo S,Zhang L,Li N.ANO1:More Than Just Calcium-Activated Chloride Channel in Cancer[J].Front Oncol,2022,12:922838.
- [7] Deng L,Yang J,Chen H,et al.Knockdown of TMEM16A suppressed MAPK and inhibited cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma[J].Onco Targets Ther,2016,9:325-333.
- [8] Chen W,Gu M,Gao C,et al.The prognostic value and mechanisms of TMEM16A in human cancer[J].Front Mol Biosci,2021,8:542156.
- [9] Wang H,Yao F,Luo S,et al.A mutual activation loop between the Ca²⁺-activated chloride channel TMEM16A and EGFR/STAT3 signaling promotes breast cancer tumorigenesis[J].Cancer Lett,2019,455:48-59.
- [10] Livak K J,Schmittgen T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method[J].Methods,2001,25(4):402-408.
- [11] Schmittgen T D,Livak K J.Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method[J].Nat Protoc,2008,3(6):1101-1108.
- [12] Mosmann T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays[J].J Immunol Methods,1983,65(1-2):55-63.
- [13] Crowley L C,Marfell B J,Scott A P,et al.Quantitation of apoptosis and necrosis by Annexin V binding,propidium iodide uptake,and flow cytometry[J].Cold Spring Harb Protoc,2016,2016(11):pdb.prot087288.
- [14] Justus C R,Leffler N,Ruiz-Echevarria M,et al.In vitro cell migration and invasion assays[J].J Vis Exp,2014,(88):51046.