

· 医药生物技术 ·

抑制 CD36 与 Nogo-B 表达抑制三阴性乳腺癌细胞增殖与迁移

汪承义, 韩际宏, 陈元利*

合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601

汪承义, 韩际宏, 陈元利. 抑制 CD36 与 Nogo-B 表达抑制三阴性乳腺癌细胞增殖与迁移[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4168-4188.

WANG Chengyi, HAN Jihong, CHEN Yuanli. Inhibition of CD36 and Nogo-B expression inhibited the proliferation and migration of triple negative breast cancer cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4168-4188.

摘要: 分化聚类 36 (cluster of differentiation 36, CD36) 是一种位于细胞表面的膜蛋白受体, 可以结合并转运脂肪酸。内质网膜蛋白 4B (Nogo-B) 在肝脏中调控脂肪酸代谢而影响肝癌的发展。目前并不清楚 CD36 和 Nogo-B 的相互作用是否能够影响乳腺癌细胞的增殖和迁移。本研究在三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)细胞中同时干预 CD36 与 Nogo-B 的表达来探索它们对细胞增殖与迁移的影响。结果表明在三阴性乳腺癌细胞中, 单独抑制 CD36 或 Nogo-B 的表达都能够抑制细胞的增殖与迁移; 同时抑制 CD36 与 Nogo-B 的表达时, 这种抑制效果更加明显, 且 Vimentin、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, BCL2) 和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达受到抑制。在小鼠移植瘤模型中, E0771 细胞转染 CD36 或 Nogo-B 的 siRNA 后成瘤能力降低; 同时敲减 CD36 和 Nogo-B 时, 肿瘤生长速度显著减慢。机制研究发现, 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达能够抑制脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4) 和脂肪酸转运蛋白 4 (fatty acid transport protein 4, FATP4) mRNA 的含量, 同时 CD36 和 Nogo-B 过表达刺激的细胞增殖被 FABP4 的 siRNA 降低, 预示着抑制乳腺癌细胞中 CD36 与 Nogo-B 的表达可能通过抑制脂肪酸的吸收和转运而抑制细胞的生长和迁移。此外, 抑制 CD36 与 Nogo-B 的表达可激活 P53-P21-Rb 信号通路, 参与抑制 CD36 与 Nogo-B 表达而抑制的细胞增殖与迁移。本研究证明同时抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达能够协同抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移, 为临床抗三阴性乳腺癌药物的开发提供了新的靶点。

关键词: 三阴性乳腺癌; 分化聚类 36; Nogo-B; 增殖; 迁移; 脂肪酸

资助项目: 国家自然科学基金(U22A20272)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20272).

*Corresponding author. E-mail: chenyanli@hfut.edu.cn

Received: 2023-01-23; Accepted: 2023-04-21

Inhibition of CD36 and Nogo-B expression inhibited the proliferation and migration of triple negative breast cancer cells

WANG Chengyi, HAN Jihong, CHEN Yuanli*

School of Food and Bioengineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: Cluster of differentiation 36 (CD36) is a membrane glycoprotein receptor capable of binding and transporting fatty acid. Nogo-B regulates the metabolism of fatty acids in the liver and affects the development of liver cancer. To date, it remains unclear whether the interaction between CD36 and Nogo-B affects the proliferation and migration of breast cancer cells. In the current study, we aimed to determine whether the interference of CD36 and Nogo-B affects the proliferation and migration of triple-negative breast cancer (TNBC) cells. The results showed that inhibition of CD36 or Nogo-B alone can inhibit the proliferation and migration of TNBC cells, and the inhibitory effect was more pronounced when CD36 and Nogo-B were inhibited simultaneously. Meanwhile, it was found that inhibition of CD36 and Nogo-B expression can inhibit the expression of Vimentin, B-cell lymphoma-2 (BCL2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *In vivo*, knockdown of CD36 or Nogo-B in E0771 cells reduced its tumorigenic ability, which was further enhanced by knockdown of CD36 and Nogo-B simultaneously. Mechanistically, inhibition of CD36 and Nogo-B expression can decrease fatty acid binding protein 4 (FABP4) and fatty acid transport protein 4 (FATP4) expression. Moreover, overexpression of CD36 and Nogo-B-induced cell proliferation was attenuated by FABP4 siRNA, indicating that inhibition of CD36 and Nogo-B expression could inhibit the absorption and transport of fatty acids, thereby inhibiting the proliferation and migration of TNBC. Furthermore, inhibition of CD36 and Nogo-B expression activated the P53-P21-Rb signaling pathway which contributed to the CD36 and Nogo-B-inhibited proliferation and migration of TNBC. Taken together, the results suggest that inhibition of CD36 and Nogo-B can reduce the proliferation and migration of TNBC, which provides new targets for the development of drugs against TNBC.

Keywords: triple negative breast cancer; cluster of differentiation 36; Nogo-B; proliferation; migration; fatty acid

乳腺癌是女性最常见的肿瘤类型，也是导致女性肿瘤死亡的最常见类型。根据世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)发布的 2020 年全球癌症数据，2020 年全球新发乳腺癌达到 226 万例，首次超过肺癌(221 万例)成为全球第

一大癌症，而我国是乳腺癌发病大国，2020 年新发乳腺癌约 42 万例，并导致近 12 万人死亡^[1]。

分化聚类 36 (cluster of differentiation 36, CD36)是一种存在于细胞表面的膜糖蛋白，可以作为脂肪酸的受体介导脂肪酸转运。有研究称 CD36 的抑制减少了脂滴的积累，并减弱了

乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[2]。在人类的心脏和骨骼肌中,CD36 被认为是提供细胞能量的主要脂肪酸受体蛋白^[3]。在脂肪细胞中,CD36 有助于长链脂肪酸(long chain fatty acid, LCFA)的摄入,并调节脂质储存的过程^[3]。肿瘤细胞的脂质成分一部分依靠各种转运蛋白运输胞外脂质进入细胞,另一部分以糖类等为原料进行生物合成,这些脂质在细胞内进行氧化供能或激活致癌信号通路,促进肿瘤细胞生长。体外和体内研究证实,CD36 通过多种分子机制参与肿瘤生长、转移和耐药性的调节^[4]。

网状蛋白家族(reticulon, RTN)定位于真核生物细胞内质网(endoplasmic reticulum, ER),是 C 端包含高度保守同源结构域的一类跨膜蛋白。在哺乳动物中,RTN 有 4 个家族成员,包括 RTN1、RTN2、RTN3 和 RTN4,每个基因都产生多种亚型。其中 RTN4 (也称为 Nogo)包括 Nogo-A、Nogo-B 及 Nogo-C 三种类型的剪切变体^[5-6]。

Nogo-B 蛋白主要定位于内质网膜和细胞膜,也可以分泌至细胞外,其在多种组织器官中表达并发挥不同的功能。目前研究发现,Nogo-B 在神经系统再生、血管内膜损伤修复等多种病理生理过程都有重要的作用^[6]。肿瘤血管生成是癌症的标志之一,Nogo-B 的表达水平与肿瘤血管密度呈正相关,Nogo-B 的敲低抑制了肿瘤血管生成^[7]。研究表明 Nogo-B 促进肝细胞中碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element binding protein, ChREBP)的表达,从而增加糖类向脂类转化,加重非酒精性脂肪肝的进展^[8]。Tian 等^[9]的研究结果显示在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中 CD36 介导氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)吸收,从而上调 Nogo-B 表达,激活 YAP 信号通路而刺激 HCC 生长。因

此,在肝癌的发生发展中,CD36 和 Nogo-B 存在上下游的调控作用,共同促进肝癌的发展。然而在乳腺癌细胞中,并不清楚两者是否存在相互调控作用。

视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma, Rb)和转录因子 P53 是肿瘤的中枢抑制因子,在抑制肿瘤增殖中具有重要作用,但是它们经常在各种肿瘤中发生失活或突变。P21 是 P53 的靶基因,它的活化依赖于 P53 的活性。有研究显示 P53 和 Rb 是骨肉瘤发展的核心驱动分子。叉头盒蛋白 P1 (forkhead box protein P1, FOXP1)作为促癌基因,通过调节 P53、P21 和 Rb 促进骨肉瘤的发展^[10]。研究表明 P53-P21-Rb 信号传导能够抑制细胞周期蛋白(cyclin A2, CCNA2),从而抑制细胞周期进程^[11]。

为了探究 CD36 与 Nogo-B 在乳腺癌的增殖与迁移中的重要作用,本研究首先根据 Kaplan-Meier Plot 数据库(<http://kmplot.com>)的数据,探索女性乳腺癌患者中 CD36 和 Nogo-B mRNA 的表达与患者预后生存率之间的关系。通过 Kaplan-Meier Plot 数据库收集了三阴性乳腺癌患者中 CD36 (#206488)和 Nogo-B (#210968) mRNA 表达量与患者预后生存率之间的关系,发现相较于低表达的患者,CD36 和 Nogo-B mRNA 高表达的女性乳腺癌患者无复发生存率显著降低(图 1),预示着 CD36 和 Nogo-B 高表达的女性乳腺癌患者可能更容易复发,同时患者的生存时间更短。这些统计数据表明 CD36 和 Nogo-B 表达量与女性乳腺癌患者预后生存率呈负相关。猜测 CD36 和 Nogo-B 共同参与三阴乳腺癌细胞增殖与迁移。基于此,本文探究 CD36 和 Nogo-B 对乳腺癌增殖与迁移的影响,同时进一步探究 CD36 和 Nogo-B 是否存在着协同作用,阐明抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达影响乳腺癌增殖与迁移的分子机制。

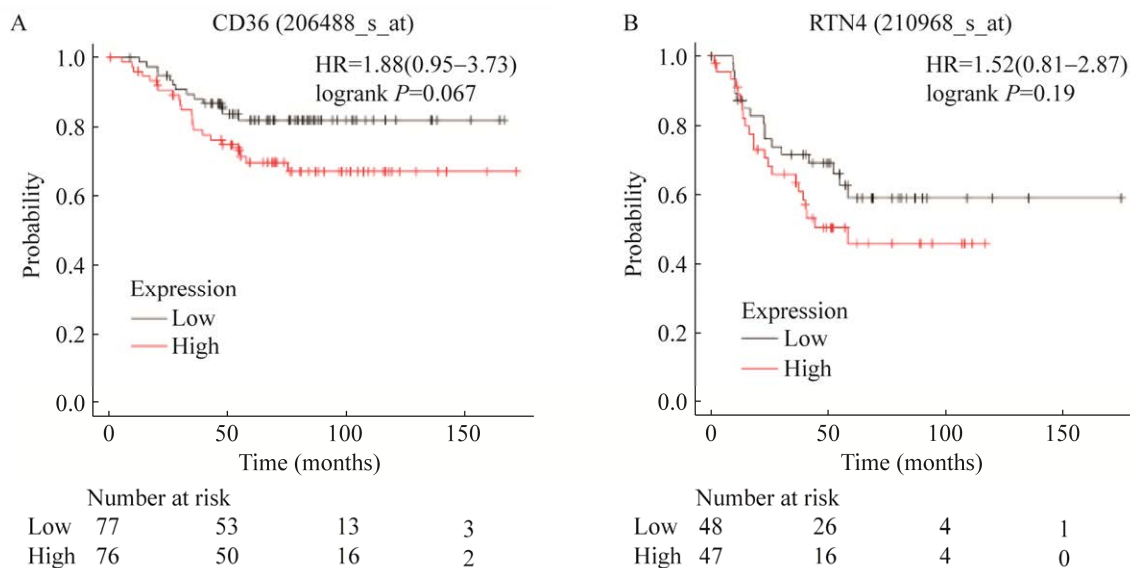


图 1 CD36 (A)和 Nogo-B (B)高表达降低患者预后生存率

Figure 1 CD36 (A) and RTN4 (B) mRNA expression data were retrieved from the gene-expression profiling dataset (#206488 and #210968, respectively, from Kaplan–Meier Plot database). The data were then used to conduct the Kaplan–Meier analysis, respectively.

1 材料与方 法

1.1 试剂和材料

DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 培养基购自 Biological Industries; 脂质体核酸转染试剂购自 Sigma; 逆转录试剂盒、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京维诺赞生物科技有限公司; anti-Nogo-B 抗体购自 Novus 公司; anti-BCL2、PCNA、HSP90、CD36、Vimentin、P53、P21、Rb 和 GAPDH 抗体购自 proteintech; 总 RNA 提取试剂购自 biosharp; 小鼠髓样乳腺癌细胞系 E0771、小鼠髓样乳腺癌细胞系 4T1 和人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.2 CD36 与 Nogo-B siRNA 和过表达载体的构建

CD36 与 Nogo-B siRNA 均购自广州锐博生物技术有限公司。同时, 构建了 CD36 和 Nogo-B

的过表达载体(构建过表达载体所用到的引物序列如表 1 所示)。收集人源的 MCF-7 细胞 RNA, 反转录后应用上述引物进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR), 获得 CD36 和 Nogo-B 的过表达目的片段。PCR 产物经过双酶切、连接反应进行过表达载体的构建, 其中 CD36 选择 pCMV-HA 载体, 而 Nogo-B 采用 pEGFP-C2 载体。所有的载体进行测序鉴定。

1.3 细胞的敲低与过表达

将细胞用完全培养基在 6 孔板中进行培养, 当细胞密度在 50%左右时, 用 RNAiMAX 试剂对细胞进行 siRNA 转染, siRNA 工作浓度为 20 nmol/L。转染 24 h 后更换完全培养基继续培养 48 h, 收集细胞蛋白和 RNA 样本, 用蛋白质印迹(Western blotting)和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测敲减率。当细胞密度在 80%左右时, 用脂质体转染试剂对细胞进行过表达载体的转染(6 孔板, 2 μ g/孔)。转染 12 h 后更换完全培养基继续培养

表 1 本实验构建过表达载体所用到的引物

Table 1 Primers used in the construction of overexpression vectors

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
CD36-F	AAATCTAGAGATGGGCTGTGACCGGAACTGTGG
CD36-R	CCACTCGAGTTATTTTATTGTTTTTCGATCTGC
Nogo-B-F	ATGAATTCATGGAAGACCTGGACCAGTCTCCTCTGG
Nogo-B-R	CAGGATCCTCATTGAGCTTTGCGCTTCAATCCAGGG

12 h, 收集细胞蛋白和 RNA 样本, 用 Western blotting 和 qPCR 检测过表达效率。

1.4 小鼠移植瘤实验与分组

小鼠实验通过合肥工业大学实验动物福利与伦理委员会审批(编号: HFUT20210910001)。C57BL/6J 小鼠购自江苏集萃药康生物技术有限公司。C57BL/6J 小鼠(约 8 周龄雌鼠)随机分成 4 组, 每组 5 只, 分别是 Control 组、siCD36 组、siNogo-B 组、siCD36+siNogo-B 组。提前 1–2 d 剃掉第四乳房垫附近的毛发, 以防止皮肤破损所造成的细胞减损。E0771 细胞分别转染阴性对照 siRNA、CD36 siRNA、Nogo-B siRNA 和 CD36 siRNA+Nogo-B siRNA。细胞转染 24 h 后, 吸去培养基, 更换完全培养基继续培养 48 h, 然后将敲低的细胞进行消化、清洗, 吸去上清, 向 15 mL 离心管中加入 3 mL PBS, 分散细胞使其分布均匀, 取 50 μ L 细胞悬液稀释 20 倍, 并使用细胞计数板计数。重新离心细胞, 并按每 100 μ L 5×10^5 个细胞的浓度加入 PBS 重悬细胞。吸取 100 μ L 细胞悬液, 移植于小鼠的第四乳房垫中。从第 7 天开始, 每 3 天测量肿瘤大小, 至 21 d 结束实验。试验结束后, 用 CO₂ 安乐死小鼠, 收集小鼠肿瘤、肝脏和肺脏组织。

1.5 细胞培养

本文选用 3 种细胞系, 分别为三阴性乳腺癌细胞系 E0771、MDA-MB-231 和 4T1。E0771 用 RPMI 1640 培养基培养(含 10%胎牛血清, 1%双抗), 4T1 和 MDA-MB-231 细胞用 DMEM 高糖培养基培养(含 10%胎牛血清、1%双抗)。

3 种细胞分别在含 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

1.6 MTT 检测细胞生存

按照每孔(96 孔板) 1×10^4 个细胞(100 μ L)吸取细胞悬液, 均匀加入 96 孔板中, 然后将其放在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。待细胞贴壁后进行相应药物的处理。实验结束后吸去培养基, 同时加入含 0.5 mg/mL MTT 的双无培养基, 细胞放置于培养箱中孵育 2–4 h。吸去培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO, 摇床孵育 15 min。使用酶标仪(伯腾仪器有限公司)于 550 nm 检测样品吸光值。

1.7 细胞克隆生成实验

细胞计数后, 按照每孔 2 000 个细胞(1 mL)吸取定量的细胞悬液至 6 孔板, 轻轻摇匀后放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞经 3–4 h 稳定后按实验需求进行处理, 连续培养至单个克隆中细胞数大于 50 个。取出 6 孔板, 每孔加入 1 mL 结晶紫染液, 染色 5–10 min。用 PBS 洗掉残余的结晶紫染液后拍照。最后用 33% 的乙酸水溶液提取细胞内的结晶紫染料, 每孔吸取 100 μ L (重复 3 次)转移至 96 孔板, 并利用酶标仪在 570 nm 处检测其吸光值。

1.8 细胞划痕迁移实验

12 孔板中细胞处理后待面积达到 80%–90% 时, 用 200 μ L 枪头在孔板底部划“十”字, 用适量 PBS 清洗, 加入完全培养基, 用 5 倍物镜进行拍照, 24 h 后再拍一次照, 计算细胞的迁移率。

1.9 Transwell 细胞侵袭实验

将转染完的细胞用胰酶消化成单细胞悬液,计数后用无血清培养基稀释细胞至 10^4 – 10^5 个细胞/mL。随后加 200 μ L 于上室中,下室加 650 μ L 新鲜的含 10% 血清的培养基。培养 24 h,除去上室内侧膜细胞。接着用 1% 结晶紫染色 10 min,镜下观察拍照,然后用 Image J 软件计算细胞数量。

1.10 流式细胞术

处理过的细胞用胰酶进行消化,用离心机进行离心,弃上清,用 PBS 将细胞沉淀吹匀,并加入 200 μ L PBS 稀释细胞。将稀释好的细胞悬液加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇中,固定 10 h 以上。之后将细胞取出,1 000 r/min、 4 $^{\circ}$ C 离心 8 min,弃上清,用预冷的 PBS 对细胞进行清洗 2 次。接着用 200 μ L 的 PBS 重悬细胞,加入 20 μ L RNase A 试剂和 20 μ L PI 试剂染色,室温孵育 30 min,最后用流式细胞仪进行检测。

1.11 细胞凋亡

处理过的细胞用胰酶进行消化,用离心机进行离心,弃上清,用 PBS 将细胞沉淀吹匀,收集 1 – 5×10^5 个细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,每次均在 1 800 r/min、 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,加入 100 μ L $1 \times$ 结合缓冲液,轻轻吹匀至单细胞悬液,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染色液,轻轻吹匀;避光、室温(20 – 25 $^{\circ}$ C)孵育 10 min;加入 400 μ L $1 \times$ 结合缓冲液,轻轻混匀,染色后样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.12 Western blotting

细胞处理完成后用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,Western blotting 检测 CD36、Nogo-B、Vimentin、BCL2、PCNA、Rb、P21 和 P53 蛋白的表达^[11-12]。用 Image J 软件对结果进行统计分析。

1.13 实时荧光定量 PCR 分析(quantitative real-time PCR, qPCR)

细胞处理完成后用 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA。采用逆转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。qPCR 检测 CD36、Nogo-B、Rb、P21、P53、CCNA2、FABP4 和 FATP4 mRNA 的表达^[11-13]。本研究使用的引物序列见表 2。

1.14 联合作用分析

金氏公式表达式: $Q = E(A+B)/(EA+EB-EA \times EB)$ 。EA、EB 分别表示 A 和 B 两种基因单独的效应; $E(A+B)$ 表示基因 A 和基因 B 联合的效应。通过判读 Q 值来评价两种基因在联合使用效果是否优于单独的效果。如果 Q 在 0.85–1.15 之间为单纯相加, $Q > 1.15$ 为协同作用, $Q < 0.85$ 为拮抗作用。

1.15 数据分析

所有的试验重复了 3 次以上,所展示的数据是具有代表性的结果。所有展示的为 $\bar{x} \pm s$ 。用 GraphPad Prism (版本 7.0) 软件用来进行 t 检验(2 组)或 one-way ANOVA 分析(多于 2 组), $P < 0.05$ 则认为具有显著性。

2 结果与分析

2.1 CD36 和 Nogo-B 在不同类型乳腺癌细胞系中的表达存在差异

为了研究 CD36 与 Nogo-B 在乳腺癌细胞中表达是否存在差异,选用了 4 株不同乳腺癌类型的细胞系: MCF-7、E0771、4T1 以及 MDA-MB-231,比较 CD36 与 Nogo-B 蛋白的表达量。结果如图 2 所示,在 E0771 与 4T1 细胞中,CD36 的表达量最高,而在 MDA-MB-231 细胞中,CD36 的表达量最低;Nogo-B 在 MCF-7 与 E0771 细胞中表达最高,在 4T1 与 MDA-MB-231 细胞中表达较低。为了研究 CD36 与 Nogo-B 的敲低或者过表达对三阴性乳腺癌细胞增殖与迁移的

表2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in qPCR

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
mus	
GAPDH-F	TGTTTCCTCGTCCCCTAG
GAPDH-R	CAATCTCCACTTTGCCACT
P53-F	ACAGTCGGATATCAGCCTCG
P53-R	GCTTCACTTGGGCCTTCAAA
P21-F	CAAAGTGTGCCGTTGTCTCT
P21-R	AAGTACTGGGCCTCTTGTCC
Rb-F	ACCCAGCAGTGCGTTATCTA
Rb-R	CATCCACCAGCTTGTCCACC
FABP4-F	TTTCTTCAAACCTGGGCGTG
FABP4-R	CATCCACCAGCTTGTCCACC
FATP4-F	GGATTCTCCCTGTTGCTCCT
FATP4-R	AGGTCCAGTGAGTGTCTGTG
CD36-F	GTGCAAAACCCAGATGACGT
CD36-R	TCCAACAGACAGTGAAGGCT
Nogo-B-F	AGACTGGAGTGGTGTTTGGT
Nogo-B-R	TGGGTGGCCTTCATCTGATT
CCNA2-F	TGTCAGTCTGGTCTTCAT
CCNA2-R	TCCGGGTAAAGAGACAGCTG
Homo	
GAPDH-F	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG
GAPDH-R	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT
P53-F	TGGCCATCTACAAGCAGTCA
P53-R	GGTACAGTCAGAGCCAACCT
P21-F	CCCAAGCTCTACCTCCCAC
P21-R	CTGAGAGTCTCCAGGTCCA
Rb-F	TCACATTCCTCGAAGCCCTT
Rb-R	ACGGTCGCTGTTACATACCA
FABP4-F	GGGCCAGGAATTTGACGAAG
FABP4-R	AAGTGACGCCTTTCATGACG
FATP4-F	AACAGCCTGTACCCTGATGG
FATP4-R	CGGTAGTGCCCATCATTCTT
CD36-F	TCACTGCGACATGATTAATGGTAC
CD36-R	ACGTCGGATTCAAATACAGCATAGAT
Nogo-B-F	AGACTGGAGTGGTGTTTGGT
Nogo-B-R	TGGGTGGCCTTCATCTGATT
CCNA2-F	CACTCTACACAGTCACGGGA
CCNA2-R	AGTGTCTCTGGTGGGTTGAG

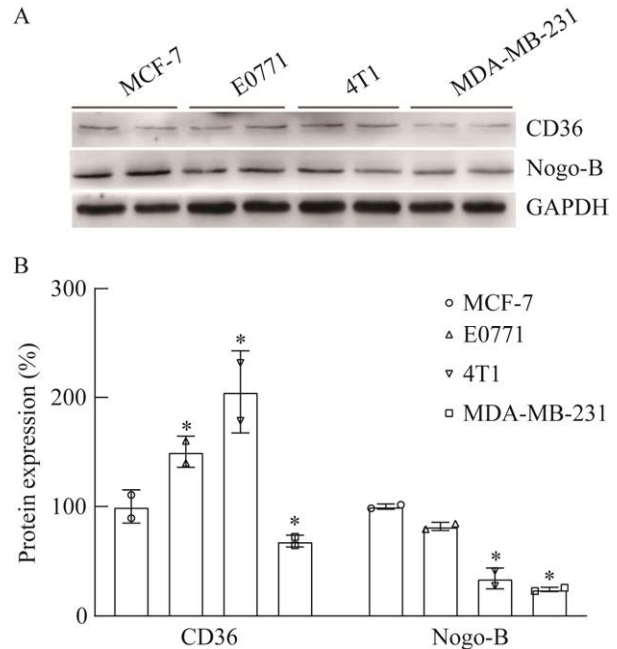


图2 不同类型细胞系 CD36 和 Nogo-B 蛋白表达
Figure 2 Expressions of CD36 and Nogo-B protein in different cell lines. A: Western blotting was used to detect the expression of CD36 and Nogo-B protein in different breast cancer cells. B: Quantitative analysis of CD36 and Nogo-B protein expression. *: $P < 0.05$ vs. protein level in MCF-7 cells ($n = 3$).

影响,后续实验中选择E0771、4T1与MDA-MB-231细胞进行实验。

2.2 CD36 和 Nogo-B 的敲低或过表达细胞的构建

为了确定 CD36 和 Nogo-B 对三阴性乳腺癌增殖的影响,将 E0771、4T1 与 MDA-MB-231 细胞分别转染 CD36 siRNA (siCD36)或 Nogo-B siRNA (siNogo-B)或两者共同转染(图 3C-3G),或用 CD36、Nogo-B 的过表达载体单独或共同转染 E0771、4T1 与 MDA-MB-231 细胞(图 3A、3B、3H-3J)。首先用 Western blotting 和 qPCR 检测敲减和过表达效率。在 3 种细胞中,siCD36 和 siNogo-B 的敲减效率大约为 50%,而过表达能够使目标蛋白上升 2 倍左右。

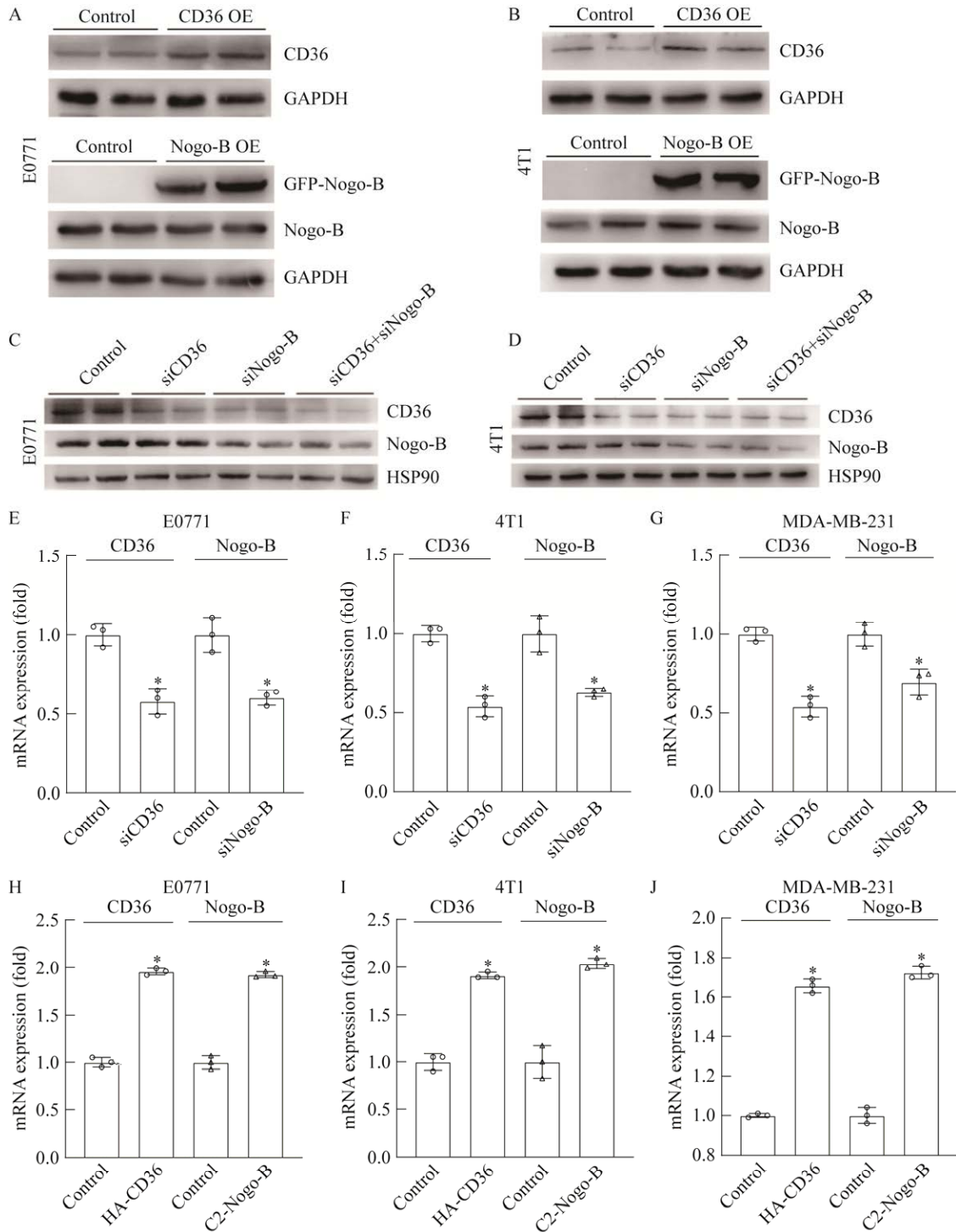


图3 CD36和Nogo-B敲低/过表达细胞的检测

Figure 3 Determination of CD36 and Nogo-B expression after knockdown or overexpression. E0771, 4T1 and MDA-MB-231 cells were transfected with siCD36, siNogo-B alone or combination or CD36 and Nogo-B overexpression vectors, and total protein or RNA was extracted after 48 h. The protein and mRNA expression of CD36 and Nogo-B was determined by Western blotting (A–D) or qPCR (E–J), respectively. *: $P < 0.05$ vs. control ($n = 3$).

2.3 CD36 和 Nogo-B 基因敲低抑制小鼠移植瘤的生长及转移

2.3.1 基因敲低 CD36 和 Nogo-B 降低 E0771 移植瘤的生长

为了在体内研究 CD36 和 Nogo-B 对肿瘤生长的影响,构建了 E0771 小鼠移植瘤模型。对 E0771 细胞单独转染 siCD36 或 siNogo-B,或两者共同转染,然后将细胞注射至小鼠第四乳房垫。结果显示一周之内肿瘤发展较缓慢,各组肿瘤大小未见明显差异。但随着天数的增加,与对照组相比,CD36 和 Nogo-B 单敲低组的肿瘤生长速度变得缓慢,并且 CD36 和 Nogo-B 双敲低组的肿瘤生长速度减缓最为明显(图 4A、4B)。Ki67 主要表达在细胞周期的活跃时期,同时较高的

Ki67 水平也预示着肿瘤的高侵袭性。为了探究敲低 CD36 和 Nogo-B 对小鼠体内肿瘤细胞增殖的影响,我们检测肿瘤组织中 Ki67 的表达。免疫组化结果显示 CD36 与 Nogo-B 单敲减降低了 Ki67 的表达,并且 CD36 与 Nogo-B 双敲减组中, Ki67 的表达进一步降低(图 4C)。

2.3.2 敲低 CD36 和 Nogo-B 抑制 TNBC 细胞向肝脏和肺脏转移

E0771 小鼠肿瘤模型中肿瘤细胞可能向肝、肺转移。对小鼠的肝脏、肺进行切片,通过 H&E 染色观察肿瘤的转移。如图 5 所示,敲低组和对对照组相比,CD36 和 Nogo-B 单敲减组降低了肿瘤细胞的转移,并且 CD36 和 Nogo-B 双敲减组中对肿瘤细胞转移的抑制效果更加明显。

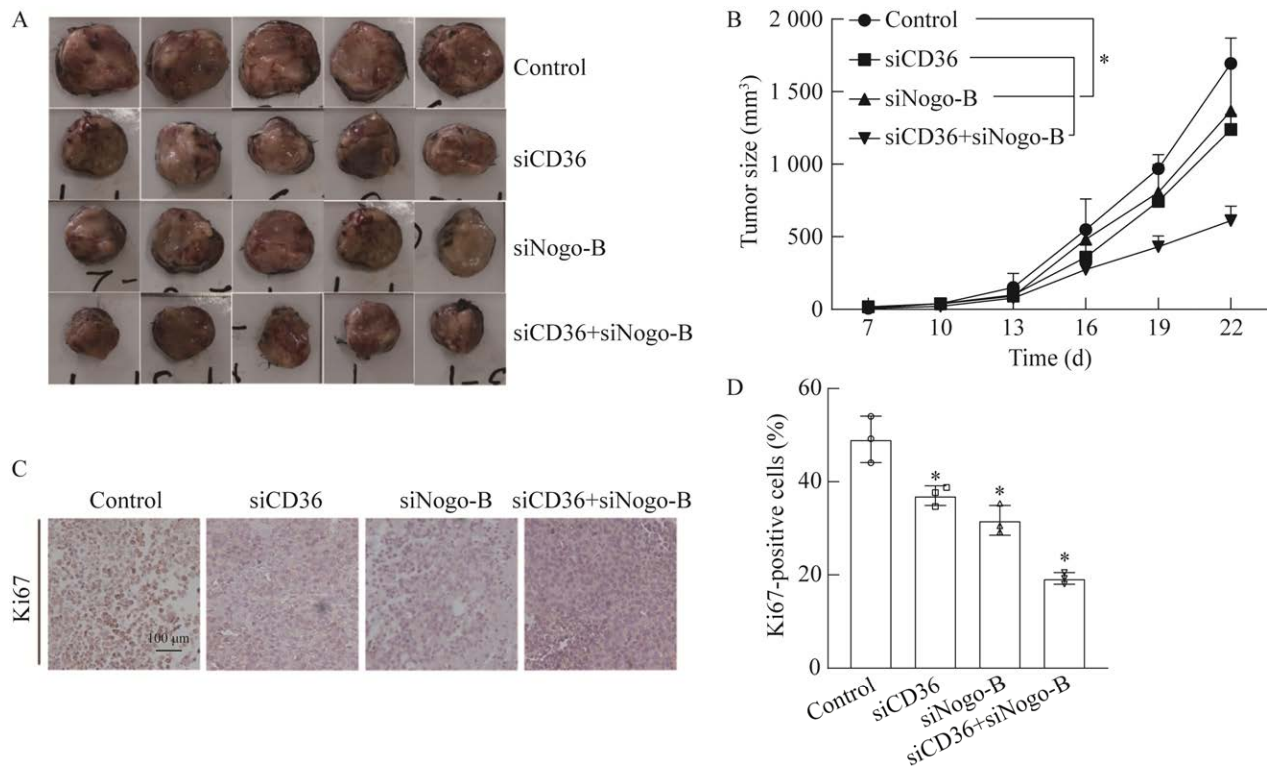


图 4 基因敲低 CD36 和 Nogo-B 降低了小鼠体内移植瘤的大小

Figure 4 Knockdown of CD36 and Nogo-B reduced the growth of E0771 xenografts in mice. A: After transfection of siCD36, siNogo-B alone or together, E0771 tumor cells were transplanted into the fourth breast pad of mice. After 22 days, the tumor was collected and photographed. B: The tumor size was measured every 3 days from day 7. C, D: The expression of Ki67 in tumor tissue was determined by immunohistochemistry. *: $P < 0.05$ vs. control ($n = 3$).

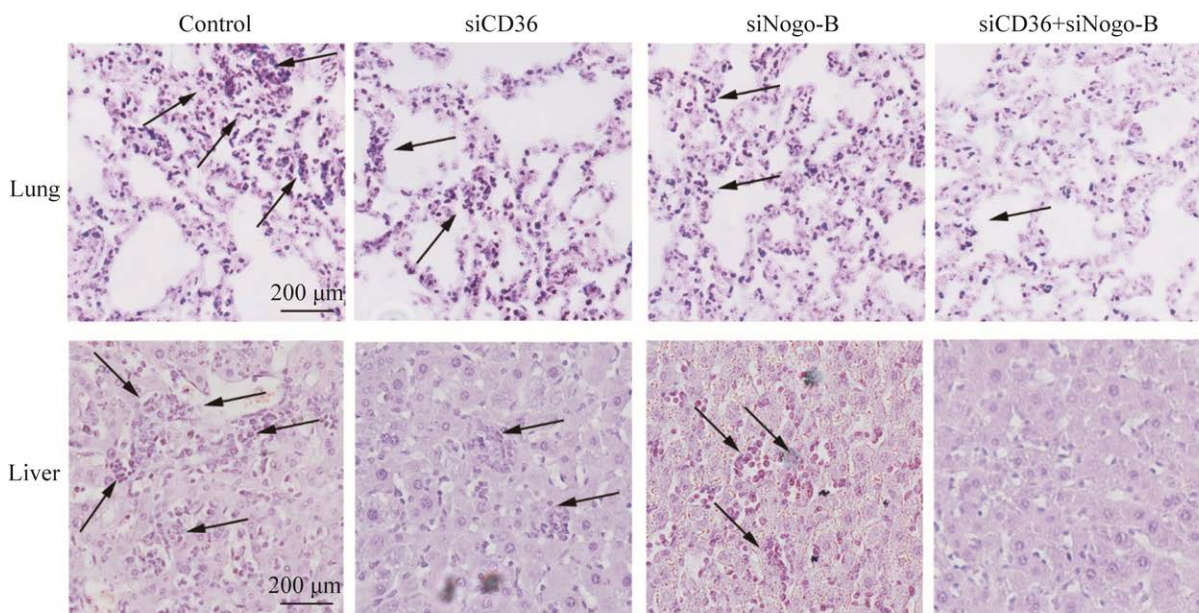


图 5 基因敲低 CD36 和 Nogo-B 抑制 TNBC 细胞向肝脏和肺脏的转移

Figure 5 Knockdown of CD36 and Nogo-B inhibits TNBC cell liver and lung metastasis. Metastasis of tumor cells in liver and lung were determined by HE staining. Three mice in each group were analyzed for the liver and lung metastasis, and the images presented were representative results.

2.4 CD36 和 Nogo-B 的敲低抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖

进一步在体外通过 MTT 实验检测 CD36 和 Nogo-B 对乳腺癌细胞增殖的影响。在 E0771、4T1 与 MDA-MB-231 细胞中, siCD36 或者 siNogo-B 减少活细胞数量, 当细胞内 CD36 和 Nogo-B 双敲低后, 活细胞的数量下降更加明显, 二者存在着协同或者单独相加的作用(图 6A, $Q=1.11$; 图 6B, $Q=0.91$; 图 6C, $Q=1.45$)。相反, CD36 和 Nogo-B 单独过表达增加活细胞数量, 同时过表达后进一步增加细胞数量, 在 E0771 细胞中存在协同作用(图 6D, $Q=1.25$), 在 MDA-MB-231 细胞中存在单独相加作用(图 6F, $Q=1.1$)。

2.5 降低 CD36 和 Nogo-B 表达抑制三阴性乳腺癌细胞的迁移

采用划痕实验以及 Transwell 实验检测 CD36 和 Nogo-B 对细胞迁移的影响。siCD36 或 siNogo-B 都能够显著抑制 E0771 和 4T1 细胞的迁

移, 两者同时存在时, 这种抑制效果更加显著, 具有明显的协同或者单独相加的作用(图 7A, $Q=0.9$ in E0771, $Q=1.2$ in 4T1; 7E, $Q=0.97$; 7F, $Q=1.16$)。相反, CD36 和 Nogo-B 单独过表达促进细胞迁移, 同样二者共同过表达时, 同样具有明显的协同或者单独相加的作用, 特别是图 7I 中, 这种促进的效果更加明显(图 7B, $Q=1.1$ in E0771 and 4T1 cells; 7G, $Q=1.24$; 7H, $Q=1.18$)。时间梯度实验结果显示随着时间的增加, 细胞的迁移受到的抑制更加明显(图 7C、7D), 表明 siCD36 或 siNogo-B 都能够以时间依赖的方式显著抑制 E0771 和 4T1 细胞的迁移。

2.6 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达减少三阴性乳腺癌细胞的克隆形成

肿瘤的干性是反应肿瘤细胞增殖与迁移的重要指标, 而克隆生成能力是反应肿瘤细胞干性的一个重要指标。为了确定 CD36 和 Nogo-B 是否影响细胞的克隆生成能力, 分别对细胞转

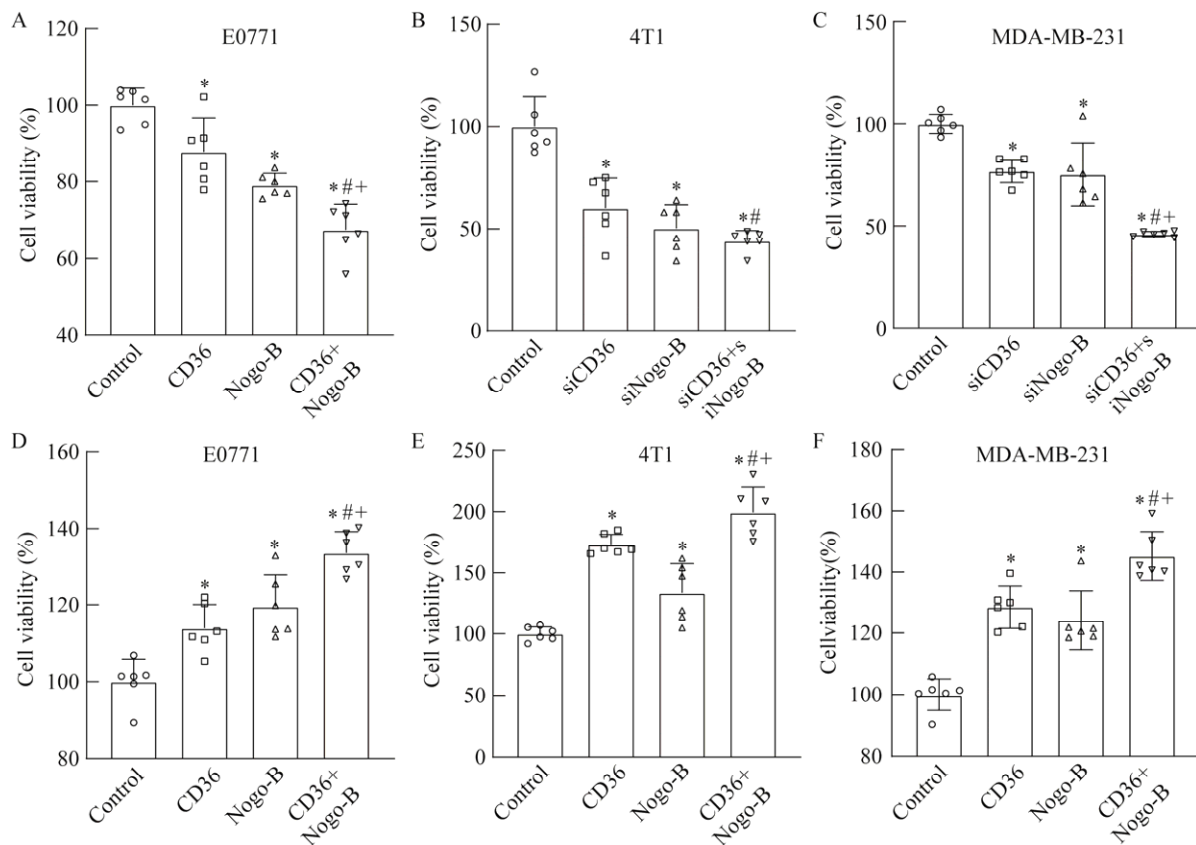


图 6 CD36 和 Nogo-B 协同刺激三阴性乳腺癌细胞的增殖

Figure 6 CD36 and Nogo-B synergistic stimulation of triple negative breast cancer cell proliferation. A–C: E0771, 4T1 and MDA-MB-231 cells were transfected with siCD36 and siNogo-B or both for 24 h, and the cell viability was detected by MTT assay. D–F: CD36 and Nogo-B alone or both were overexpressed in E0771, 4T1 and MDA-MB-231 cells for 12 h, and cell viability was detected by MTT assay. All values are presented as mean±SD; *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 6$).

染 siCD36 和 siNogo-B 或 CD36 和 Nogo-B 的过表达载体, 检测细胞的克隆生成情况。结晶紫染色以及定量统计结果表明, siCD36 或 siNogo-B 显著抑制 E0771 与 4T1 细胞的克隆能力, 且 CD36 与 Nogo-B 双敲减条件下, 这种抑制的效果更明显, 且二者存在着相互协同的作用(图 8A, $Q = 1.49$; 8B, $Q = 1.2$)。相反, CD36 或 Nogo-B 单过表达显著促进细胞的克隆生成能力, 且 CD36 和 Nogo-B 同时过表达条件下, 这种促进的效果更明显, 在 E0771 细胞中存在协同作用(图 8C, $Q = 1.36$), 而在 4T1 细胞中存在单独相

加的作用(图 8D, $Q = 1.1$)。

2.7 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达促进细胞的凋亡

细胞凋亡(apoptosis)是一种主动性细胞死亡事件, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控。通过 FACS 检测抑制 CD36 和 Nogo-B 表达是否促进细胞的凋亡。结果显示在 E0771 和 4T1 细胞中, 无论是敲低 CD36 或者敲低 Nogo-B 都促进了细胞的凋亡, 而在 CD36 和 Nogo-B 双敲低的情况下, 细胞凋亡更加明显, 且二者存在着简单相加的作用(图 9B, $Q = 1.03$)。

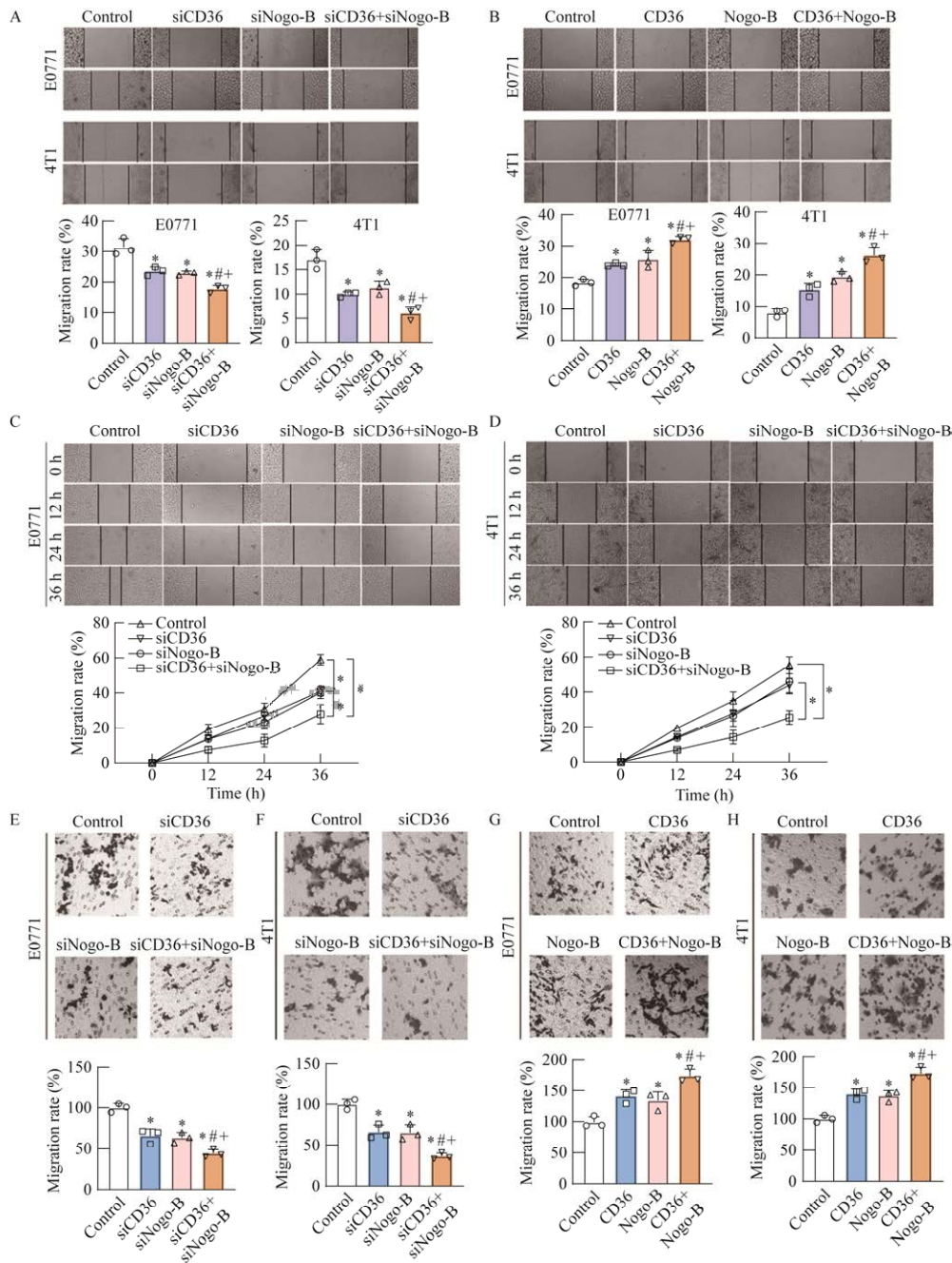


图7 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达协同抑制三阴性乳腺癌细胞的迁移

Figure 7 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression synergistic inhibition of migration of triple-negative breast cancer cells. A, C, D: siCD36 and siNogo-B alone or both were transfected into E0771 and 4T1 cells for 24 h (A) or the indicated times (E, F), and the cross lanes were photographed. Then, the migration rate was calculated. B: CD36 and Nogo-B alone or both were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h, then, cross lanes were drawn. The photos were taken at 0 h and 24 h, and migration rate was calculated. E, F: E0771 and 4T1 cells were transfected with siCD36 and siNogo-B or together for 24 h, and the migration was determined by trans-well assay. G, H: CD36 and Nogo-B alone or both were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h, and the migration was determined by trans-well assay. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 3$).

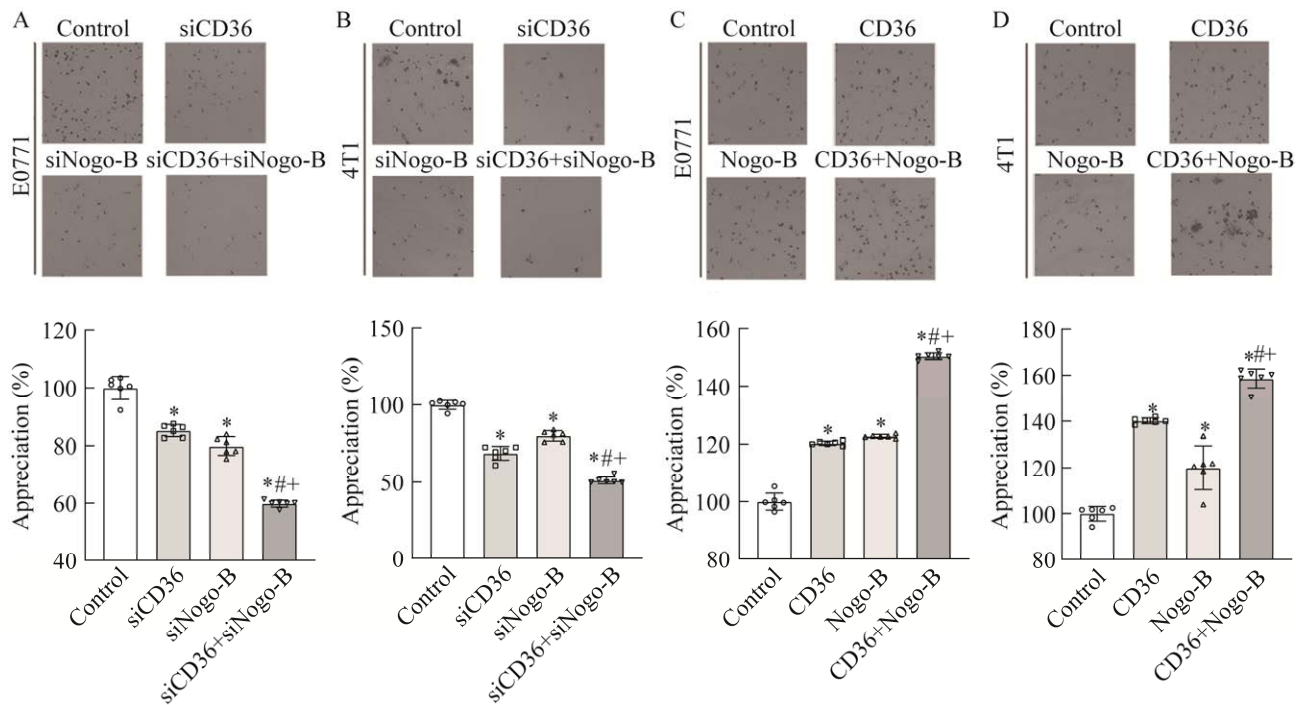


图 8 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达降低三阴性乳腺癌细胞的克隆生成

Figure 8 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression decreased the cloning of triple negative breast cancer cells. A–B: siCD36 and siNogo-B alone or both were transfected into E0771 and 4T1 cells for 24 h. The cells were cultured for 7 d. After crystal purple staining, photos were taken, and then the dye was dissolved with 33% acetic acid. The absorbance of the solution was detected by enzyme label instrument. C–D: CD36 and Nogo-B alone or both were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h. After cultured for another 14 d, the cells were stained with crystal purple and photographed. Then the dyes were dissolved with 33% acetic acid. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 6$).

2.8 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制细胞增殖、迁移和抗凋亡相关蛋白的表达

进一步检测 CD36 和 Nogo-B 对细胞增殖、迁移、凋亡相关基因表达的影响。促增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是促进细胞周期的关键基因, BCL2 是关键的抗凋亡蛋白, 而波形蛋白 (vimentin, VIM) 是肿瘤细胞内皮-间质转化过程中间质表型关键标志, 预示着细胞迁移能力增强^[14]。细胞转染 CD36 与 Nogo-B 的 siRNA 后, 检测 PCNA、BCL2 和 VIM 的蛋白表达水平。Western blotting 结果表明, siCD36 和 siNogo-B 抑制了 PCNA、BCL2 和 VIM 蛋白的表达 (图 10A、10B)。

2.9 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制细胞进入 S 期

为了探究 CD36 和 Nogo-B 影响三阴性乳腺癌增殖的分子机制, 首先检测 CD36 和 Nogo-B 是否调控细胞周期。分别对 E0771 和 4T1 细胞转染 siCD36 和 siNogo-B 以及 CD36 和 Nogo-B 的过表达载体。转染 siCD36 和 siNogo-B, 抑制细胞的 S 期, 增加 G0/G1 期细胞的占比, 降低 G2/M 期的占比, 从而抑制细胞的增殖 (图 11A、11B)。相反, CD36 和 Nogo-B 的过表达促进细胞的 S 期、G2/M 期的占比, 降低 G0/G1 期的占比, 促进细胞增殖 (图 11C、11D)。

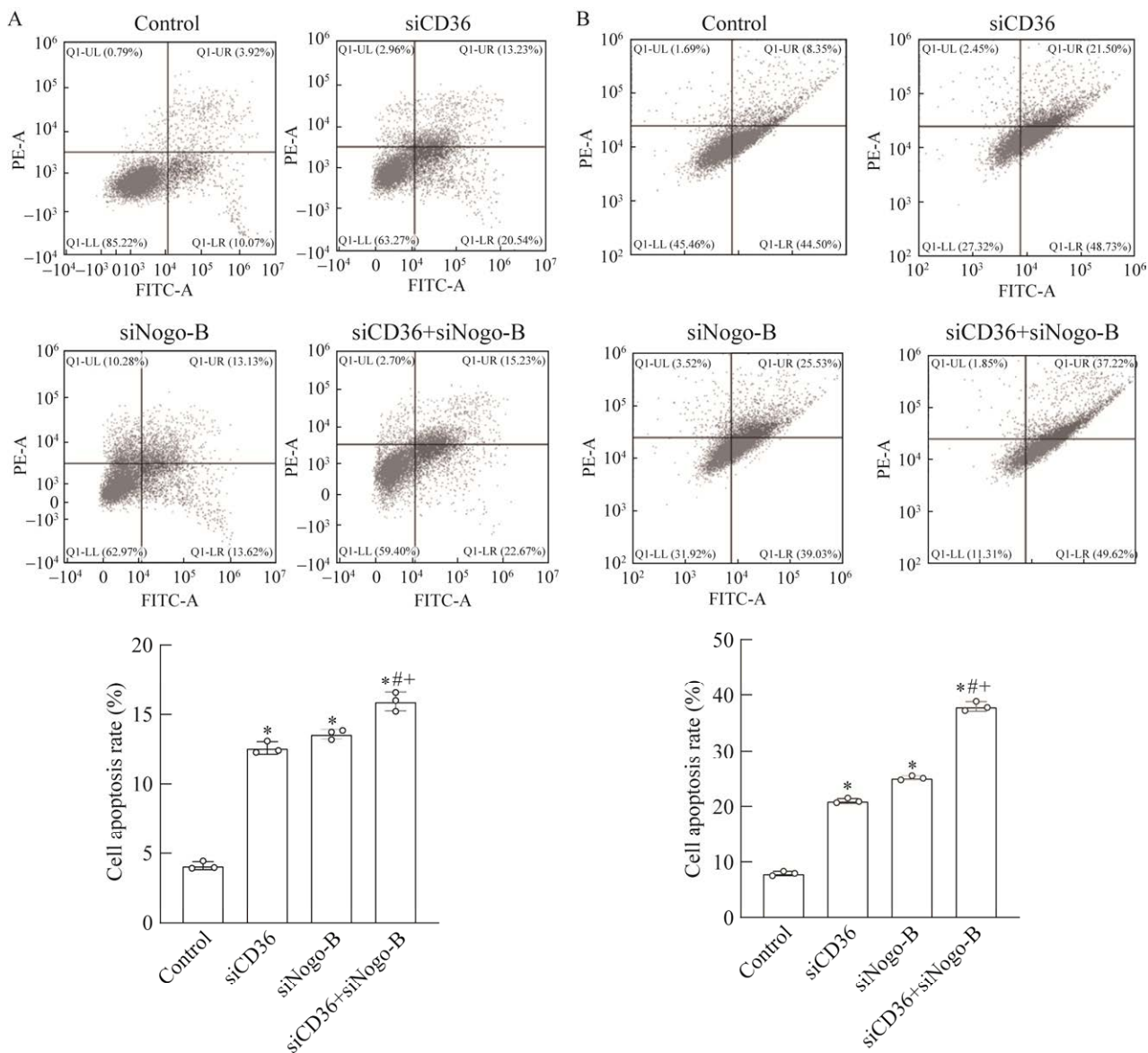


图9 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达促进三阴性乳腺癌细胞的凋亡

Figure 9 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression promoted apoptosis of triple-negative breast cancer cells. E0771 (A) and 4T1 (B) cells were transfected with siCD36 or siNogo-B alone or both for 24 h, and the cell was stained with 5 μ L Annexin V-FITC and 5 μ L PI staining solution, and the apoptosis of the cells was detected by flow cytometry. Among them, Q1-LL represents the proportion of living cells, Q1-LR represents the proportion of early apoptotic cells, and Q1-UR represents the proportion of late apoptotic cells. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 3$).

2.10 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达激活 P53-P21-Rb 信号通路

为了进一步确定抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制 E0771 细胞和 4T1 细胞生长的分子机制,

检测了 CD36 和 Nogo-B 对 P53、P21 和 Rb 蛋白以及 mRNA 表达的影响。抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达能够促进 P53、P21 和 Rb 蛋白以及 mRNA 的表达(图 12A-12D)。相反, CD36

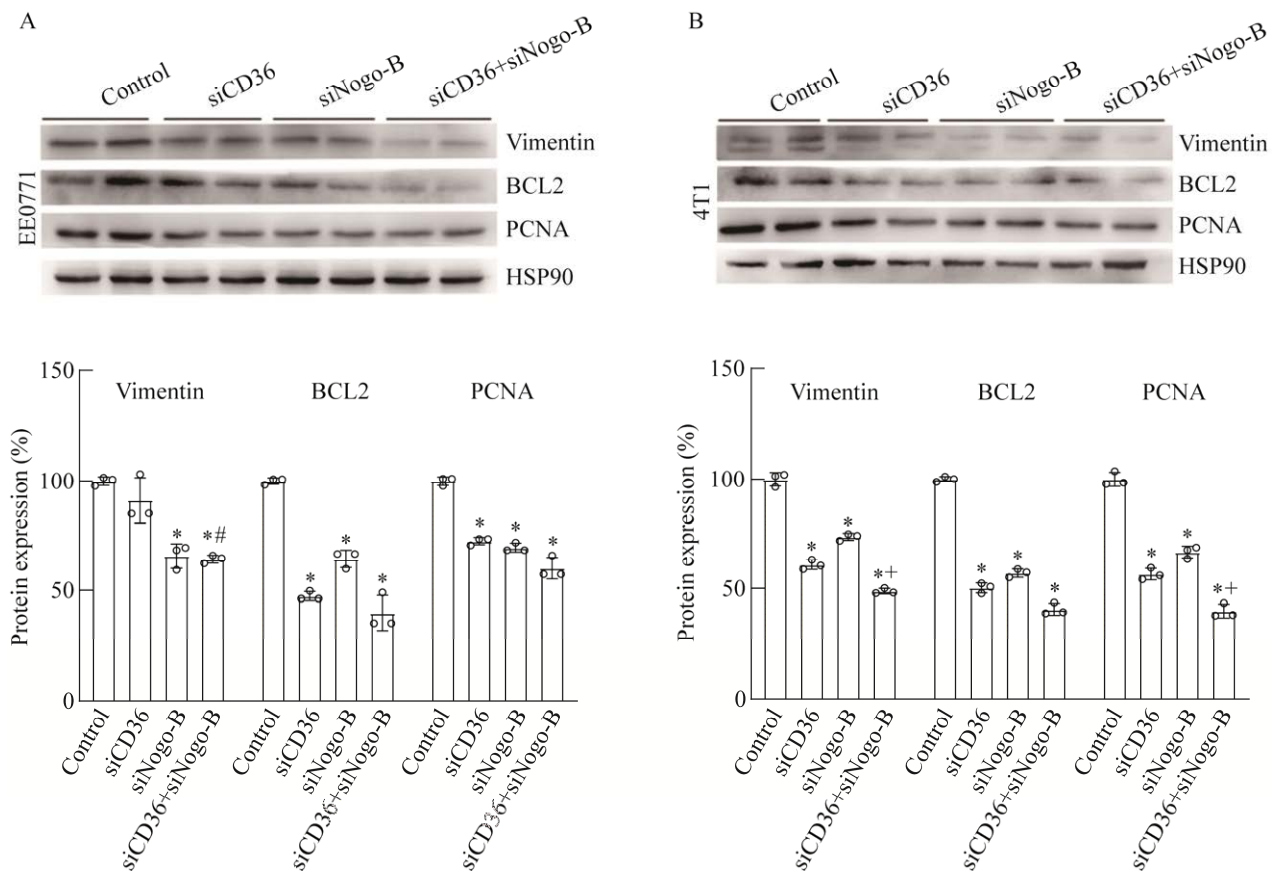


图 10 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制了细胞增殖与迁移相关蛋白的表达

Figure 10 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression inhibited the expression of proteins related to cell proliferation and migration. A–B: siCD36 or siNogo-B alone or together were transfected into E0771 and 4T1 cells for 24 h. Total protein was extracted to determine the expressions of CD36, Nogo-B, vimentin, BCL2 and PCNA proteins by Western blotting. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 3$).

和 Nogo-B 的过表达降低了 P53、P21 和 Rb mRNA 的表达(图 12E、12F)。当将 P53 进行敲低后同时转染 siCD36 和 siNogo-B (图 12G), 发现 siCD36 和 siNogo-B 抑制细胞增殖的效果被逆转了(图 12H)。Rb 是细胞周期的中心调节因子^[11], 有研究称细胞周期蛋白 A (cyclin A2, CCNA2) 基因在肝细胞癌中上调, 可作为肝细胞癌预后不良的分子标志物^[15], 当激活 P53-P21-Rb 信号通路时, 会下调 CCNA2 基因的表达^[11]。当同时转染 siCD36 和 siNogo-B 时, 抑制 CCNA2 mRNA 的表达(图 12I)。推测抑制

CD36 和 Nogo-B 表达激活 P53-P21-Rb 信号通路, 从而抑制细胞的增殖。

2.11 基因敲低 CD36 和 Nogo-B 抑制脂肪酸吸收和转运相关基因表达

为了进一步确定 CD36 和 Nogo-B 影响乳腺癌增殖和迁移的分子机制, 检测了 CD36 和 Nogo-B 对 FABP4 和 FATP4 表达的影响。发现抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达能够抑制 FABP4 与 FATP4 mRNA 的表达(图 13A、13B)。相反, CD36 和 Nogo-B 的过表达能够增加 FABP4 和 FATP4 mRNA 的表达(图 13C、13D)。当我们

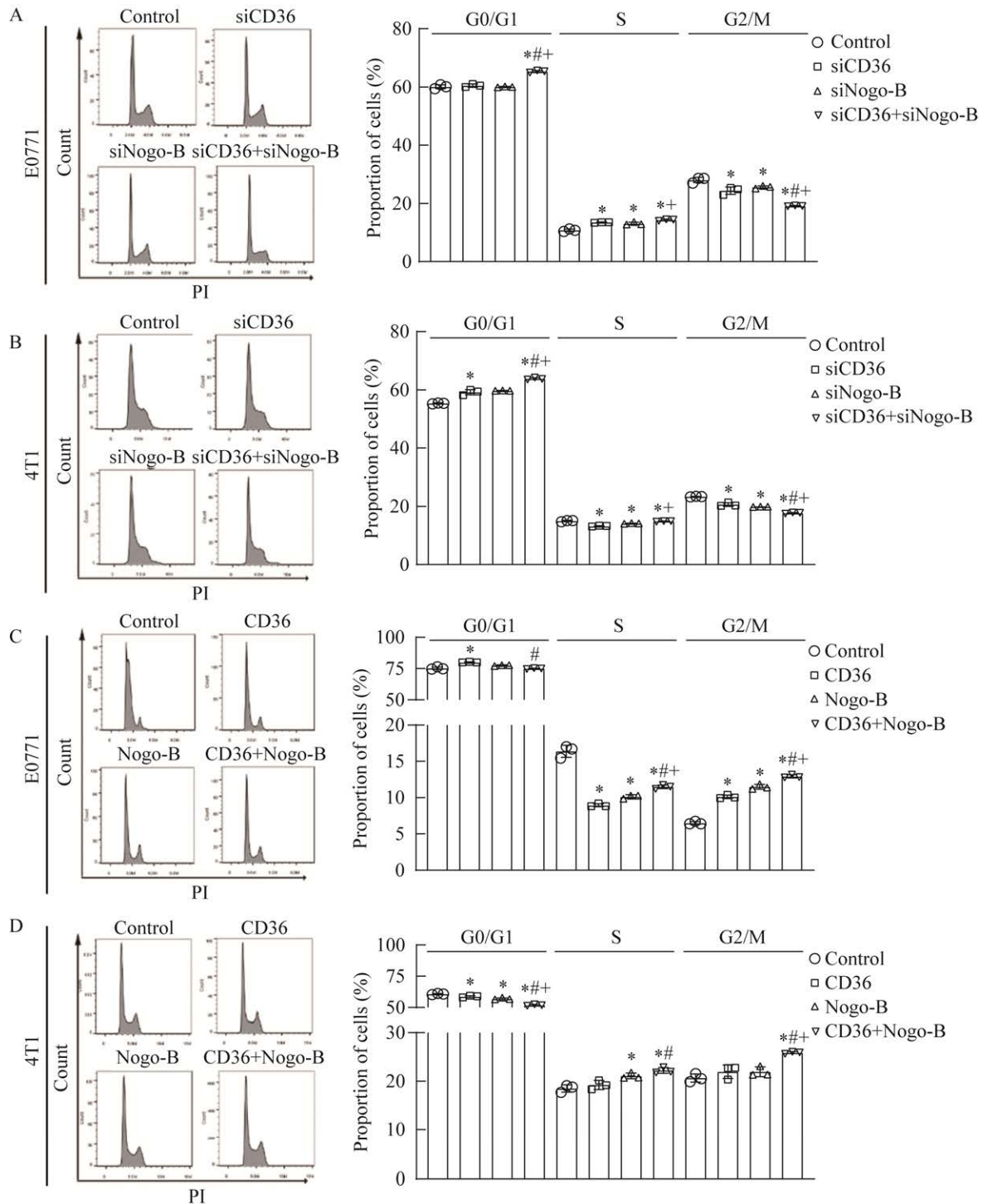


图 11 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制细胞进入 S 期

Figure 11 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression inhibited G1/S phase transition. A–B: siCD36 and siNogo-B alone or together were transfected into E0771 and 4T1 cells for 24 h. Cell cycles were detected by flow cytometry. C–D: CD36 and Nogo-B alone or together were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h. Cell cycles were detected by flow cytometry. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n=3$).

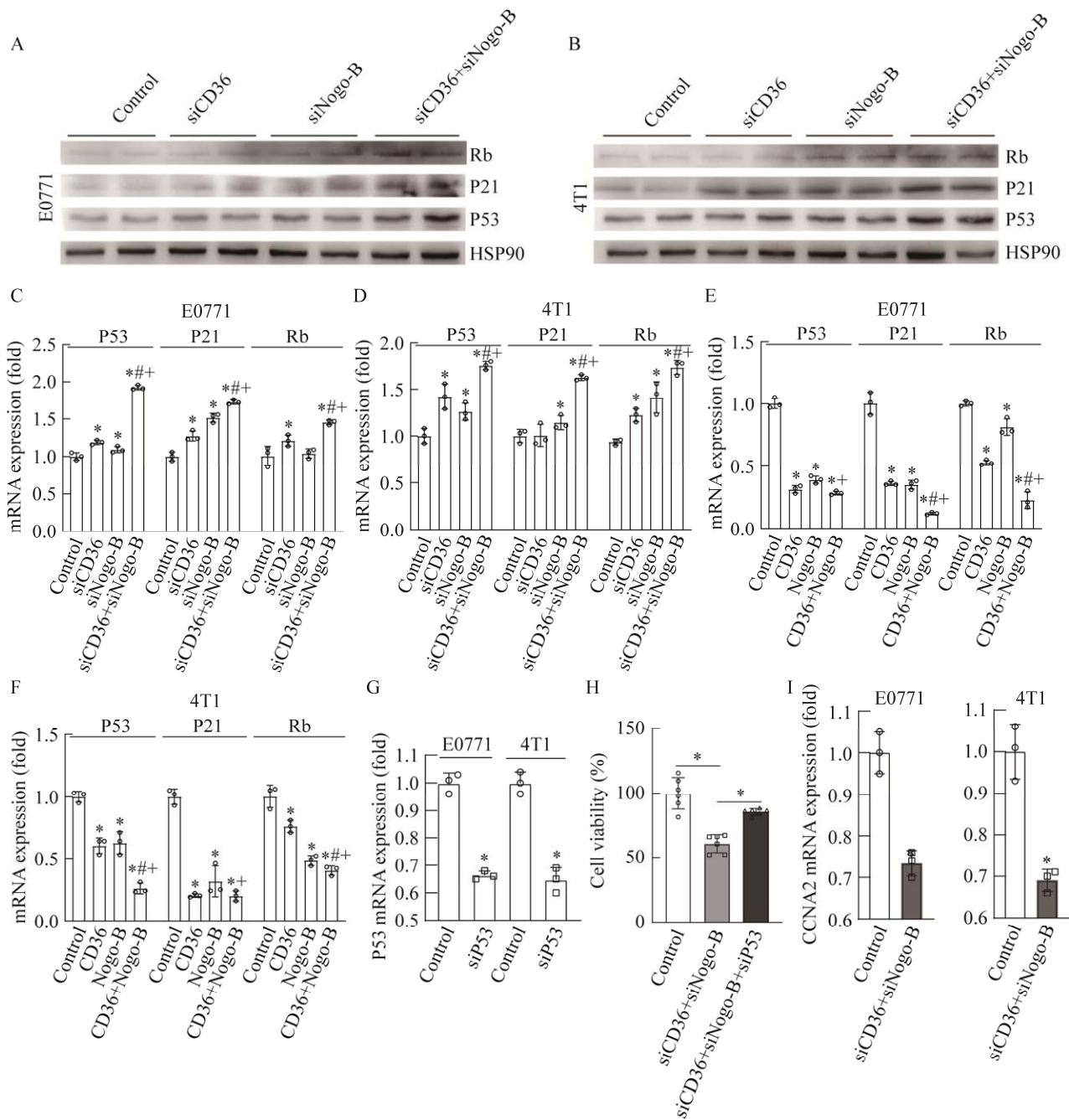


图 12 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达激活了 P53-P21-Rb 信号通路

Figure 12 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression activated the P53-P21-Rb signaling pathway. A–D: siCD36, siNogo-B alone or together were transfected into E0771 and 4T1 cells. The protein and mRNA expression levels of P53, P21 and Rb were detected by Western blotting (A, B) or qPCR (C–D), respectively. E–F: CD36 and Nogo-B alone or together were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h. mRNA expression levels of P53, P21 and Rb were detected by qPCR. G: siP53 was transfected into E0771 and 4T1 cells. The mRNA expression level of P53 was detected by qPCR. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; †: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n = 3$). H, I: The viability of E0771 and 4T1 cells which were transfected with siCD36 plus siNogo-B or siCD36, siNogo-B plus siP53, was detected by MTT assay. *: $P < 0.05$ ($n = 6$).

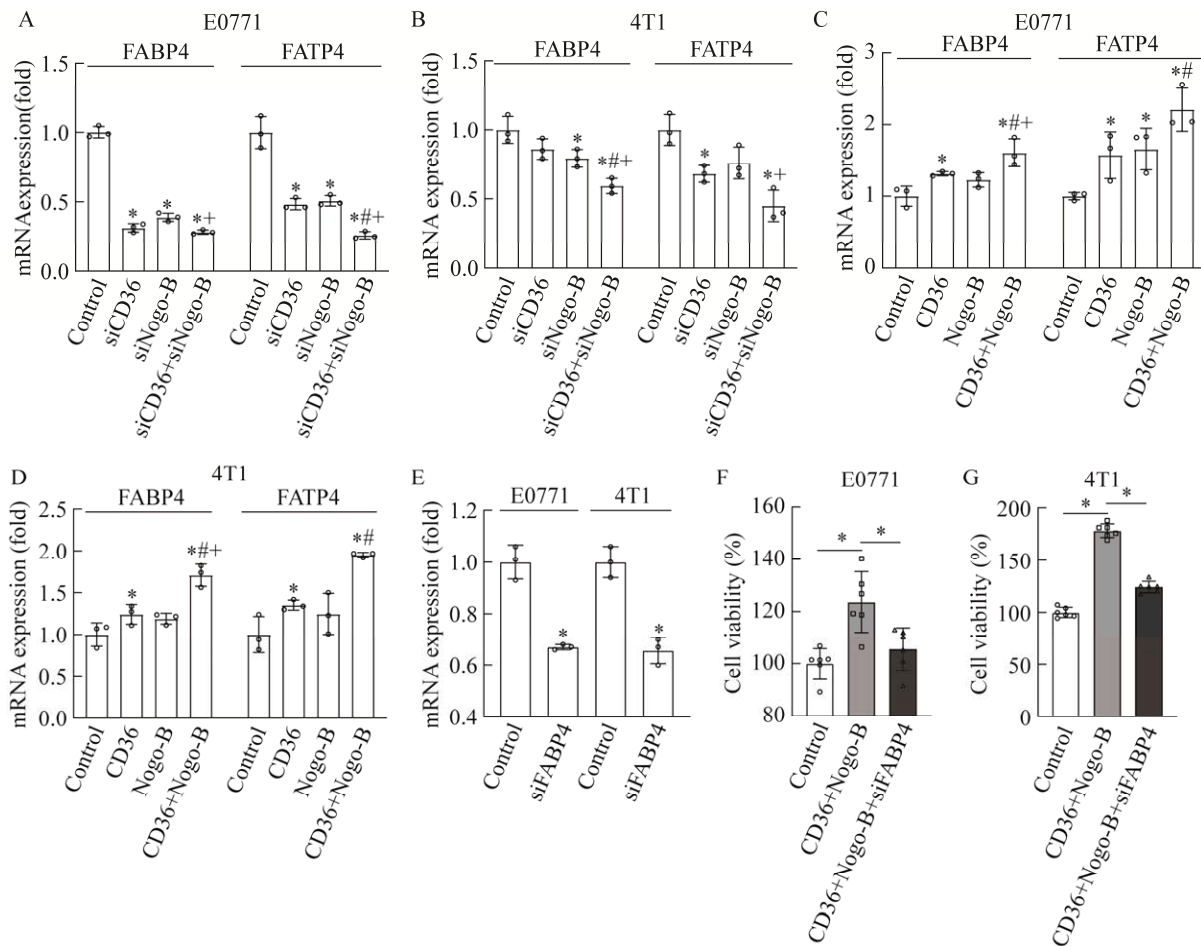


图 13 抑制 CD36 和 Nogo-B 表达抑制 FABP4 和 FATP4 mRNA 的表达

Figure 13 Inhibition of CD36 and Nogo-B expression inhibited FABP4 and FATP4 mRNA expression. A–B: After siCD36, siNogo-B alone or co-transfection in E0771 and 4T1 cells for 24 h, expression of FABP4 and FATP4 mRNA were detected by qPCR. C–D: CD36 and Nogo-B alone or together were overexpressed in E0771 and 4T1 cells for 12 h. Expression of FABP4 and FATP4 mRNA were detected by qPCR. E–F: CD36 and Nogo-B overexpression vector or FABP4 siRNA were transfected into E0771 and 4T1 cells. Expression of CD36, Nogo-B and FABP4 were detected by qPCR. *: $P < 0.05$ vs. control; #: $P < 0.05$ vs. siCD36; +: $P < 0.05$ vs. siNogo-B ($n=3$). G–H: E0771 and 4T1 cells were overexpressed with CD36 plus Nogo-B or CD36, Nogo-B plus siFABP4, then the cell viabilities were detected by MTT assay. *: $P < 0.05$ ($n=6$).

将 FABP4 进行敲低以后同时进行转染 CD36 和 Nogo-B 的过表达载体(图 13E), 发现 CD36 和 Nogo-B 促进细胞增殖的效果被逆转了(图 13F、13G)。推测 CD36 和 Nogo-B 可能通过抑制脂肪酸的吸收, 从而抑制了乳腺癌的增殖和迁移。

3 讨论

乳腺癌已超越肺癌, 成为全球第一大癌, 新发病例数为 226 万。肿瘤细胞中代谢途径常常进行重编程, 以调节营养物质的吸收和新陈代谢, 以维持能量的产生^[16]。脂质是肿瘤代谢

能量来源的重要组成部分。肿瘤细胞依靠各种转运蛋白或受体蛋白来介导脂质的运输, 激活致癌信号通路^[17]。CD36 是一种存在于细胞表面的膜糖蛋白, 与脂肪酸结合以促进其运输以进行脂质利用^[18]。研究表明 CD36 的表达与脂质过氧化和铁死亡密切相关, CD36 通过摄取肿瘤环境中的脂肪酸, 尤其是多不饱和脂肪-花生四烯酸, 导致了 CD8⁺ T 细胞内脂质过氧化物的堆积, 铁离子含量升高, 铁死亡过程增多, 杀伤性的细胞因子分泌减少^[19]。在肝癌 (hepatic cellular cancer, HCC) 中激活 CD36 表达可以增强游离脂肪酸的摄取, 导致上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 增强, 促进 HCC 进展。有研究表明, CD36、FABPs 和 CPT1 是脂肪酸吸收相关的分子, 有助于胃癌细胞的增殖^[18,20]。本研究表明 CD36 能够促进三阴性乳腺癌的增殖、迁移和克隆生成能力。

Nogo-B 蛋白作为跨膜功能蛋白, 位于多种组织器官中而发挥不同的功能。同时, Nogo-B 对于肿瘤的生长和凋亡、神经系统再生和血管内膜损伤修复等多种病理生理过程都有重要的作用^[5]。如在肝癌细胞中, 过表达 Nogo-B 后促进永生化肝细胞 LO2 和肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞生长, 使用慢病毒介导 SK-Hep1 和 MHCC97H 细胞 Nogo-B 基因敲除, 导致显著的生长抑制^[9]。

在鼻咽癌细胞和组织中 Nogo-B 表达更高, Nogo-B 过表达可以增加鼻咽癌细胞在体外和体内的迁移、侵袭和转移能力^[21]。Nogo-B 的表达水平与肝细胞癌中的肿瘤血管密度呈正相关。研究表明, Nogo-B 过表达促进了人 HCC 细胞系肿瘤异种移植皮下模型中的肿瘤血管生成^[7]。在肝脏中, Nogo-B 敲除能够适当地调节 ChREBP, 从而少量降低肝脏脂质水平^[8]。Tian 等^[9]的研究结果显示在 HCC 中 CD36 介导

oxLDL 吸收激活 Nogo-B 表达, 进而激活 YAP 信号通路而刺激 HCC 生长。本研究发现 Nogo-B 高表达的乳腺癌患者预后不佳, 抑制 Nogo-B 表达能够抑制三阴性乳腺癌细胞增殖、迁移和克隆生成。有趣的是发现同时抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达时能够协同抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和克隆生成。通过细胞周期实验表明抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达通过调控细胞周期来影响 E0771 和 4T1 细胞的增殖。

近年来脂肪酸代谢与肿瘤间的关系成为研究热点。在肿瘤细胞中, 脂肪酸代谢对其生长及转移具有重要意义^[22]。而 CD36 和 Nogo-B 都能够影响脂肪酸的代谢和转运。FABP 是细胞内脂质伴侣家族, 通过结合和再分布细胞内脂肪酸来协调细胞内的脂质反应。FABP4 与肿瘤关系密切, 它除了能够为转运脂肪酸提供能量外, 还能结合并转运各种配体, 参与肿瘤细胞内的各种信号通路^[23]。有报道称, FABP4 可通过多种潜在的途径促进乳腺癌的发生发展, 如 FABP4 也可以通过促进脂肪酸的转运来促进肿瘤进展^[24]。同时研究表明, FABP4 的过表达增强了人类肿瘤细胞中脂肪酸的摄取^[25]。此外, 高表达的 FABP4 与人类乳腺癌和通过上皮-间充质转化的肿瘤进展有关^[17]。FABP4 高表达可促进乳腺癌肿瘤的进展^[26]。在本研究中, 发现抑制 CD36 与 Nogo-B 的表达抑制了 FABP4 和 FABP4 mRNA 的表达, 推测 CD36 和 Nogo-B 通过抑制脂肪酸转运, 从而抑制了乳腺癌细胞的增殖与迁移^[27]。

P53 通过激活脂肪酸氧化和抑制脂肪酸合成而发挥肿瘤负调控作用^[28]。P53 的活化会抑制脂肪细胞的分化^[29], 而 P53 的敲除会增加脂肪的积累^[30]。脂肪组织增加导致雌激素水平、炎症细胞因子、脂肪因子和氧化应激上升, 参与了肥胖相关的乳腺癌发病机制^[31]。研究表明

P53-P21-Rb 信号通路对细胞周期具有调节作用。在 P53 激活后, P21 表达上调。高水平的 P21 导致 Rb-E2F 复合物的形成和大量细胞周期基因的下调^[11]。由于 CD36 和 Nogo-B 通过调控细胞周期来影响的增殖, 为了进一步探究 CD36 和 Nogo-B 影响乳腺癌细胞的增殖、迁移的分子机制, 检测了 CD36 和 Nogo-B 对 P53-P21-Rb 信号通路的影响。结果表明抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达促进了 P53、P21 和 Rb mRNA 的表达量, 相反, CD36 和 Nogo-B 的过表达能够抑制 P53、P21 和 Rb。P53 的 siRNA 能够阻断 CD36 和 Nogo-B 敲减而降低的细胞增殖。因此, 推测抑制 CD36 和 Nogo-B 通过激活 P53-P21-Rb 信号通路, 从而抑制了细胞的增殖与迁移。

4 结论

综上所述, 研究证明抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达可能协同抑制三阴性乳腺癌细胞对脂肪酸的吸收和转运, 影响细胞中脂肪酸代谢, 进而激活 P53-P21-Rb 信号通路, 抑制细胞增殖、迁移和克隆生成。抑制 CD36 和 Nogo-B 的表达发挥协同抗肿瘤作用, 可能是三阴性乳腺癌的一种新的治疗策略, 为相关药物的开发提供了靶点。

REFERENCES

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] ZAOUI M, MOREL M, FERRAND N, FELLAHI S, BASTARD JP, LAMAZIÈRE A, LARSEN AK, BÉRÉZIAT V, ATLAN M, SABBABH M. Breast-associated adipocytes secretome induce fatty acid uptake and invasiveness in breast cancer cells via CD36 independently of body mass index, menopausal status and mammary density[J]. Cancers, 2019, 11(12): 2012.
- [3] GLATZ JFC, LUIKEN JJFP. From fat to FAT (CD36/SR-B2): understanding the regulation of cellular fatty acid uptake[J]. Biochimie, 2017, 136: 21-26.
- [4] 梁宇. CD36 促进 ER 阳性乳腺癌细胞增殖与迁移的作用与机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2019.
LIANG Y. The function and mechanism of CD36-induced ER positive breast cancer cells proliferation and migration[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [5] 毛青, 李强. Nogo-B 结构及功能[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(9): 521-524.
MAO Q, LI Q. The structure and function of Nogo-B[J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34(9): 521-524 (in Chinese).
- [6] ZHU B, CHEN SB, HU XD, JIN XF, LE YC, CAO LH, YUAN ZH, LIN Z, JIANG SM, SUN LC, YU L. Knockout of the nogo-B gene attenuates tumor growth and metastasis in *Hepatocellular carcinoma*[J]. Neoplasia (New York, N Y), 2017, 19(7): 583-593.
- [7] CAI H, SAIYIN H, LIU X, HAN DD, JI GQ, QIN B, ZUO J, SHEN SQ, YU WB, WU JX, WU YH, YU L. Nogo-B promotes tumor angiogenesis and provides a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. Molecular Oncology, 2018, 12(12): 2042-2054.
- [8] ZHANG S, GUO FL, YU M, YANG XX, YAO Z, LI Q, WEI Z, FENG K, ZENG P, ZHAO D, LI XJ, ZHU Y, MIAO QR, IWAKIRI Y, CHEN YL, HAN JH, DUAN YJ. Reduced Nogo expression inhibits diet-induced metabolic disorders by regulating ChREBP and insulin activity[J]. Journal of Hepatology, 2020, 73(6): 1482-1495.
- [9] TIAN Y, YANG B, QIU WN, HAO YJ, ZHANG ZX, YANG B, LI N, CHENG SQ, LIN ZJ, RUI YC, CHEUNG OKW, YANG WQ, WU WKK, CHEUNG YS, LAI PBS, LUO JJ, SUNG JJY, CHEN RS, WANG HY, CHENG ASL, et al. ER-residential Nogo-B accelerates NAFLD-associated HCC mediated by metabolic reprogramming of oxLDL lipophagy[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3391.
- [10] LI HJ, HAN XG, YANG SB, WANG YJ, DONG Y, TANG TT. FOXP1 drives osteosarcoma development by repressing P21 and RB transcription downstream of P53[J]. Oncogene, 2021, 40(15): 2785-2802.
- [11] ENGELAND K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling[J]. Cell Death and Differentiation, 2022, 29(5): 946-960.
- [12] 潘昭吉. 胃癌间质干细胞中 YAP 信号在胃癌发展过程中的作用[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2017.
PAN ZJ. The role of YAP signaling in gastric cancer

- derived mesenchymal stem cells in cancer progression[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2017 (in Chinese).
- [13] 朱军, 唐矛. 脂肪酸转运蛋白4在肾透明细胞癌中的表达及临床意义[J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(4): 425-427, 441.
ZHU J, TANG M. Expression and clinical significance of fatty acid transporter 4 in renal clear cell carcinoma[J]. Journal of Inner Mongolia Medical University, 2021, 43(4): 425-427, 441 (in Chinese).
- [14] PATTANAYAK B, LAMEIRINHAS A, TORRES-RUIZ S, BURGUÉS O, ROVIRA A, TERESA MARTÍNEZ M, TAPIA M, ZAZO S, ALBANELL J, ROJO F, BERMEJO B, EROLES P. Role of SALL4 in HER2+ breast cancer progression: regulating PI3K/AKT pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(21): 13292.
- [15] 杨结. CCNA2 基因在肝细胞癌中的表达、信号通路和预后关系生物信息分析及验证[D]. 天津: 天津医科大学硕士学位论文.
YANG J. Expression of CCNA2 gene in hepatocellular carcinoma, biological information analysis and verification of the relationship between signal pathway and prognosis[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Medical University (in Chinese).
- [16] SUN LC, ZHANG HF, GAO P. Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer[J]. Protein & Cell, 2022, 13(12): 877-919.
- [17] CHEN RQ, CHEN LG. Solute carrier transporters: emerging central players in tumour immunotherapy[J]. Trends in Cell Biology, 2022, 32(3): 186-201.
- [18] HAO JW, WANG J, GUO HL, ZHAO YY, SUN HH, LI YF, LAI XY, ZHAO N, WANG X, XIE CC, HONG LX, HUANG X, WANG HR, LI CB, LIANG B, CHEN S, ZHAO TJ. CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4765.
- [19] MA XZ, XIAO LL, LIU LT, YE LQ, SU P, BI EG, WANG Q, YANG MJ, QIAN JF, YI Q. CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8⁺ T cell effector function and impairs their antitumor ability[J]. Cell Metabolism, 2021, 33(5): 1001-1012.e5.
- [20] HOY ANDREW J, NAGARAJAN SHILPA R, BUTLER LISA M. Tumour fatty acid metabolism in the context of therapy resistance and obesity[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(12): 753-766.
- [21] WANG JY, ZHONG Q, ZHANG H, LIU SX, LI SB, XIA TL, XIAO ZW, CHEN RH, YE YC, LIANG FY, HAN P, HUANG XM. Nogo-B promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via RhoA-SRF-MRTFA pathway[J]. Cell Death & Disease, 2022, 13: 76.
- [22] 黄威, 程忠平. 脂肪酸代谢与肿瘤的发生、发展和转移的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2018, 30(12): 879-882.
HUANG W, CHENG ZP. Fatty acid metabolism and tumor occurrence, development and metastasis[J]. Cancer Research and Clinic, 2018, 30(12): 879-882 (in Chinese).
- [23] 张雨, 刘芳. FABP4 在肿瘤发生发展的初步研究进展[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(6): 577-579.
ZHANG Y, LIU F. Preliminary research progress of FABP4 in tumor occurrence and development[J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2020, 31(6): 577-579 (in Chinese).
- [24] ZENG J, SAUTER ER, LI B.. FABP4: a new player in obesity-associated breast cancer[J]. Trends in Molecular Medicine, 2020, 26(5): 437-440.
- [25] KRAMMER J, DIGEL M, EHEHALT F, STREMMEL W, FÜLLEKRUG J, EHEHALT R. Overexpression of CD36 and acyl-CoA synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 increases fatty acid uptake in human hepatoma cells[J]. International Journal of Medical Sciences, 2011, 8(7): 599-614.
- [26] KIM YS, JUNG J, JEONG H, LEE JH, OH HE, LEE ES, CHOI JW. High membranous expression of fatty acid transport protein 4 is associated with tumorigenesis and tumor progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. Disease Markers, 2019, 2019: 1-7.
- [27] CABRÉ A, LÁZARO I, GIRONA J, MANZANARES JM, MARIMÓN F, PLANA N, HERAS M, MASANA L. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria[J]. Clinical Chemistry, 2008, 54(1): 181-187.
- [28] PUZIO-KUTER AM. The role of p53 in metabolic regulation[J]. Genes & Cancer, 2011, 2(4): 385-391.
- [29] HALLENBORG P, FEDDERSEN S, MADSEN L, KRISTIANSEN K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2009, 13(2): 235-246.
- [30] WANG XW, ZHAO XC, GAO X, MEI YD, WU M. A new role of p53 in regulating lipid metabolism[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2013, 5(2): 147-150.
- [31] SIMONE V, D'AVENIA M, ARGENTIERO A, FELICI C, RIZZO FM, de PERGOLA G, SILVESTRI F. Obesity and breast cancer: molecular interconnections and potential clinical applications[J]. The Oncologist, 2016, 21(4): 404-417.

(本文责编 郝丽芳)