

硫化氢合成酶 CBS 和 CSE 对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响

赵蒙蒙¹, 王雅璐¹, 许宇翔¹, 杨凯歌¹, 曹玉文¹, 周文虎², 费晶³, 王雯⁴, 罗成华¹, 胡建明¹
(1. 石河子大学医学院病理学系 石河子大学第一附属医院病理科, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学第一附属医院肿瘤科, 新疆 石河子 832002; 3. 中南大学湘雅药学院药剂学系, 湖南 长沙 410013; 4. 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 北京 100069)

[摘要] **目的:** 探讨胱硫醚-β-合酶 (CBS) 和胱硫醚-γ-裂解酶 (CSE) 的表达及其对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 选择15例乳腺癌患者的乳腺癌组织和癌旁正常组织, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 法检测乳腺癌组织和癌旁正常组织以及 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中 CBS 和 CSE 的 mRNA 及蛋白表达水平。将 MCF-7 细胞分为 siNC 组 (转染 siNC) 和 siCBS 组 (转染 siCBS), MDA-MB-231 细胞分为 ovNC 组 (转染 CSE 过表达空载质粒) 和 ovCSE 组 (转染 CSE 过表达质粒)。CCK-8 法检测各组乳腺癌细胞的增殖活性, Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移和侵袭细胞数, Western blotting 法检测各组乳腺癌细胞中 E 钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达水平。**结果:** 与癌旁正常组织比较, 乳腺癌组织中 CBS 和 CSE mRNA 及蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 MDA-MB-231 细胞比较, MCF-7 细胞中 CBS mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 MCF-7 细胞比较, MDA-MB-231 细胞中 CSE 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。与 siNC 组比较, siCBS 组 MCF-7 细胞增殖活性、迁移和侵袭细胞数、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与 ovNC 组比较, ovCSE 组 MDA-MB-231 细胞增殖活性、迁移和侵袭细胞数、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** CBS 和 CSE 在乳腺癌组织中表达上调, 高水平的 CBS 和 CSE 促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化 (EMT)。

[关键词] 胱硫醚-β-合酶; 胱硫醚-γ-裂解酶; 硫化氢; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 细胞迁移

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-02-26 **[录用日期]** 2024-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82103290); 新疆维吾尔自治区人力资源和社会保障厅“天池英才”计划项目 (CZ003103); 新疆生产建设兵团科技研究指导项目 (2022ZD003, 2023ZD029); 新疆生产建设兵团科技计划项目 (2024DA041); 石河子大学国家大学生创新创业训练计划项目 (202410759083); 石河子大学青年创新拔尖人才项目 (CXBJ202207); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关项目 (2023AB0S8)

[作者简介] 赵蒙蒙 (1998—), 女, 山东省淄博市人, 在读硕士研究生, 主要从事乳腺肿瘤基础方面的研究。

[通信作者] 胡建明, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: jianming.120@163.com);
罗成华, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: 15700979599@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effects of hydrogen sulfide synthase CBS and CSE on malignant biological behaviour of breast cancer cells

ZHAO Mengmeng¹, WANG Yalu¹, XU Yuxiang¹, YANG Kaige¹, CAO Yuwen¹, ZHOU Wenhui², FEI Jing³, WANG Wen⁴, LUO Chenghua¹, HU Jianming¹

(1. Department of Pathology, School of Medicine, Shihezi University, Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 3. Department of Pharmacy, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China; 4. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions of cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE) and their effects on the malignant biological behaviours of breast cancer cells, and to elucidate their mechanisms. **Methods:** The breast cancer tissue and paracancerous normal tissue from 15 cases of patients were selected, and RT-qPCR and Western blotting methods were used to detect the mRNA and protein expression levels of CBS and CSE in breast cancer tissue, paracancerous normal tissue, MCF-7 cells, and MDA-MB-231 cells. The MCF-7 cells were divided into siNC group (transfected with siNC) and siCBS group (transfected with siCBS), and the MDA-MB-231 cells were divided into ovNC group (transfected with CSE over-expression empty plasmid) and ovCSE group (transfected with CSE over-expression plasmid). CCK8 assay was used to detect the proliferation activities of breast cancer cells in various groups, Transwell assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells in various groups, and Western blotting method was used to detect the protein expression levels of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin proteins in the breast cancer cells in various groups. **Results:** Compared with paracancerous normal tissue, the expression levels of CBS and CSE mRNA and proteins in breast cancer tissue were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with MDA-MB-231 cells, the CBS mRNA expression level in the MCF-7 cells was increased ($P < 0.05$); compared with MCF-7 cells, the expression level of CSE protein in the MDA-MB-231 cells was decreased ($P < 0.05$). Compared with siNC group, the proliferation activity, the numbers of migration and invasion cells, the expression levels of N-cadherin and Vimentin proteins in the MCF-7 cells in siCBS group were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of E-cadherin protein was increased ($P < 0.05$). Compared with ovNC group, the proliferation activity, the numbers of migration and invasion cells, and the expression levels of N-cadherin and Vimentin proteins in the MDA-MB-231 cells in ovCSE group were increased ($P < 0.05$), while the expression level of E-cadherin protein was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expressions of CBS and CSE are upregulated in breast cancer tissue, and high levels of CBS and CSE promote proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells.

KEYWORDS Cystathionine- β -synthase; Cystathionine- γ -lyase; Hydrogen sulfide; Breast neoplasms; Cell proliferation; Cell migration

乳腺癌是全球最常见的癌症之一。2020年, 女性乳腺癌占有所有癌症病例的11.7%, 约12.9%的女性会患乳腺癌^[1-2]。在女性中, 乳腺癌相对于其他癌症是导致死亡的主要原因^[1]。从手术治疗发展至放疗、化疗、内分泌治疗、靶向治疗和免疫治

疗, 乳腺癌治疗已取得较大进展, 但仍有部分患者会发生局部复发或远处转移, 导致其生存率下降^[3-4]。因此探索新的治疗方式和治疗靶点成为未来重要研究方向。硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 是一种重要的气体递质, 在人体中发挥着重要的功

能^[5]。H₂S发挥促进肿瘤的生长、细胞迁移、细胞侵袭、血管生成和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等作用^[6]。研究^[7]显示:低浓度持续加入外源性的H₂S可以通过诱导肿瘤抑制因子sONE(一种新型长链非编码RNA)降低乳腺癌细胞的侵袭性^[7]。在哺乳动物中,H₂S主要由胱硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS)、胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)和3-巯基丙酮酸-硫转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST)产生。H₂S合成酶已被证实在多种肿瘤中高表达^[6]。通过抑制H₂S合成酶减少内源性H₂S的释放,从而抑制肿瘤的进展^[8]。但目前H₂S在癌症进展中的作用尚存在争议,且H₂S合成酶在乳腺癌中研究较少,其在乳腺癌中具体的调控作用尚未明晰。因此,本研究通过实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)和Western blotting法验证H₂S合成酶在乳腺癌中的表达,沉默CBS和过表达CSE来进一步探讨H₂S合成酶在乳腺癌中的具体分子机制,以期为乳腺癌提供新的治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 乳腺癌标本、细胞、主要试剂和仪器 收集2022年4月—2023年11月于石河子大学第一附属医院进行乳腺癌手术15例患者的样本作为研究对象。选择距肿瘤组织>5 cm且病理诊断为非癌组织作为癌旁正常组织。所有患者的病理诊断均为乳腺浸润性导管癌,术前均未接受过放疗、化疗及其他肿瘤相关治疗。本研究经石河子大学第一附属医院医学伦理委员会批准(伦理号:KJ2023-433-01),且所有患者均已签署知情同意书。MCF-7细胞购自武汉赛维尔生物科技有限公司,MDA-MB-231细胞购自上海复祥生物科技有限公司,胎牛血清购自以色列BI公司,TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II购自日本宝日生物技术有限公司,BCA蛋白定量检测试剂盒购自美国Thermo Fisher公司,CCK-8检测试剂盒购自兰杰柯科技有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司,CBS抗体、CSE抗体、E钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、神经钙黏蛋白(N-cadherin)抗体和波形蛋白(Vimentin)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,GAPDH抗体购自中杉金桥公司,CBS小干扰RNA(siCBS)及其阴性对照(siNC)由上海吉玛公司提供,

Lipo8000[™]转染试剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司,CSE过表达质粒(over expression CSE, ovCSE)和阴性对照(ovNC)购自重庆优宝生物技术有限公司,质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,细胞爬片购自北京索莱宝科技有限公司。全自动酶标仪购自美国Thermo Fisher公司,OLYMPUS CKX53倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司,Gelview 6000Pro II化学发光仪购自广州博鹭腾生物科技有限公司,7500 Fast Real Time PCR System荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.2 细胞培养、分组和转染 MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞用含有10%的胎牛血清与1%青-链霉素混合液的DMEM培养基,5% CO₂、37℃且具有一定湿度的培养箱中培养,2~3 d传代1次。取处于对数生长期的MCF-7细胞分为siNC组(转染siNC)和siCBS组(转染siCBS),MDA-MB-231细胞分为ovNC组(转染CSE过表达空载质粒)和ovCSE组(转染CSE过表达质粒)。

按照Lipo8000[™]转染试剂说明书将siCBS及其阴性对照siNC转染至MCF-7细胞中,过表达CSE质粒和CSE过表达空载质粒转染至MDA-MB-231细胞中。转染后的细胞生长24和48 h后进行RT-qPCR和Western blotting实验或其他实验。

1.3 RT-qPCR法检测乳腺癌组织以及乳腺癌细胞中CBS和CSE mRNA表达水平 采用TRIzol裂解组织和细胞,收集上清,利用氯仿、异丙醇和无水乙醇提取RNA,并按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为总体积20 μL的cDNA,利用TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒进行PCR扩增。PCR法反应条件:95℃、30 s,95℃、5 s,60℃、20 s,40个循环。以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因表达水平。引物序列见表1。

1.4 Western blotting法检测乳腺癌组织中CBS和CSE以及各组乳腺癌细胞中EMT相关蛋白表达水平 采用RIPA裂解液提取组织和各组细胞的蛋白,使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度的测定。利用SDS-PAGE电泳分离蛋白,采用湿转法将蛋白转移至PVDF膜上,使用5%的脱脂奶粉封闭2 h,封闭结束后按照对应比例加入CBS、CSE、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和GAPDH一抗,4℃摇床孵育过夜。第2天进行洗膜、孵育二抗、

表1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

Gene	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
CBS	TCGTGATGCCTGAGAAGATG	TTGGGGATTTTCGTTCTTCAG
CSE	GGACTCCAGCTTCACTCCGCTT	TTAGCGGGTCTGCAGTCTCAG
GAPDH	GTCTCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

曝光。使用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.5 CCK-8法检测各组细胞增殖活性 细胞转染后, 按照每孔3 000~5 000个细胞数量, 将各组细胞铺于96孔细胞培养板中。待细胞贴壁后, 按照所需检测时间0、24、48和72 h, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 继续置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养2~4 h后, 采用全自动酶标仪检测各孔吸光度(A)值。细胞增殖活性=[(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)] \times 100%, 空白组仅加入培养基(用于调零)。

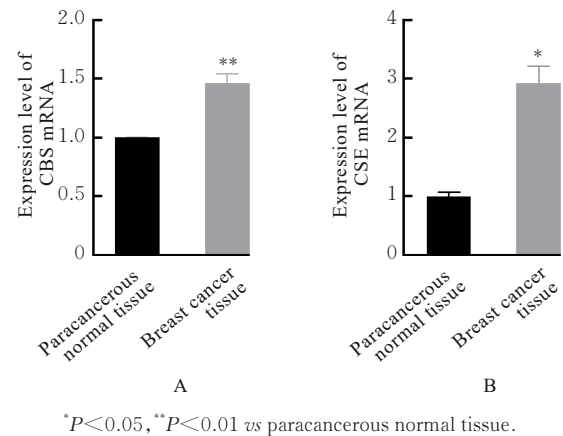
1.6 Transwell小室实验检测各组细胞迁移和侵袭细胞数 Transwell细胞迁移实验: 将转染好的各组细胞进行消化计数, 向上室中接种200 μ L无血清的单细胞悬液, 下室为600 μ L含20%血清的培养基, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养。24 h后将24孔细胞培养板取出, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗小室, 4%多聚甲醛固定30 min, 结晶紫染色20 min, 用棉签轻轻擦去小室内部的细胞, 干燥后于倒置显微镜下拍照, 最后采用Image J图像软件进行迁移细胞计数。Transwell细胞侵袭实验除需使用基底胶之外, 其他步骤与细胞迁移实验相同。

1.7 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。乳腺癌组织、癌旁正常组织以及各组细胞中CBS和CSE的mRNA及蛋白表达水平, 各组细胞增殖活性、迁移细胞数、侵袭细胞数、细胞中E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和癌旁正常组织中CBS及CSE mRNA以及蛋白表达水平 RT-qPCR法检测结果

显示: 与癌旁正常组织比较, 乳腺癌组织中CBS和CSE mRNA表达水平升高($P<0.05$)。见图1。Western blotting法检测结果显示: 在乳腺癌组织中CBS和CSE蛋白表达水平明显高于癌旁正常组织($P<0.01$)。见图2。

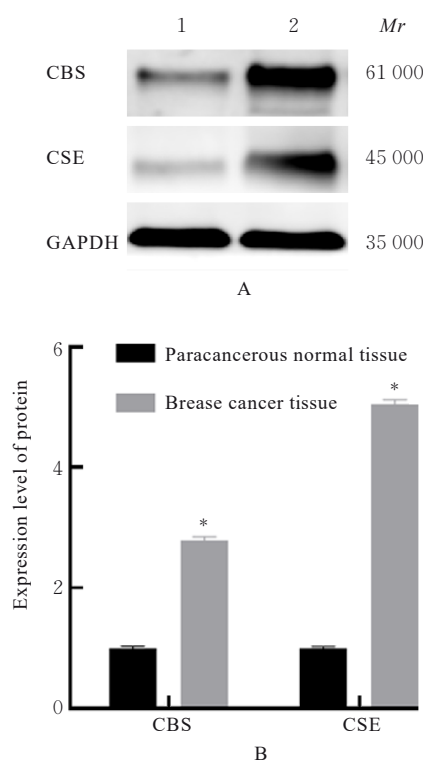


* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs paracancerous normal tissue.
图1 癌旁正常组织和乳腺癌组织中CBS(A)及CSE(B) mRNA表达水平

Fig. 1 Expression levels of CBS (A) and CSE (B) mRNA in paracancerous normal tissue and breast cancer tissue

2.2 在不同乳腺癌细胞中CBS和CSE mRNA及蛋白表达水平 RT-qPCR和Western blotting法检测结果显示: 与MDA-MB-231细胞比较, MCF-7细胞中CBS mRNA表达水平升高($P<0.01$), 在2株乳腺癌细胞中CSE mRNA表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Western blotting法检测结果显示: 与MCF-7细胞比较, MDA-MB-231细胞中CSE蛋白表达水平降低($P<0.01$)。见图3和4。因此本研究选择在MCF-7细胞中敲低CBS, 在MDA-MB-231细胞中过表达CSE, 分析通过干预调控2种 H_2S 关键酶后对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响。

2.3 siCBS和ovCSE转染条件的筛选 首先采用RT-qPCR和Western blotting法确定CBS是否在MCF-7中敲低, 结果显示: 与siNC组比较, CBS



Lane 1: Paracancerous normal tissue; Lane 2: Breast cancer tissue. * $P < 0.01$ vs paracancerous normal tissue.

图2 Western blotting法检测癌旁正常组织和乳腺癌组织中CBS及CSE蛋白表达电泳图(A)以及直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of CBS and CSE proteins in paracancerous normal tissue and breast cancer tissue detected by Western blotting method

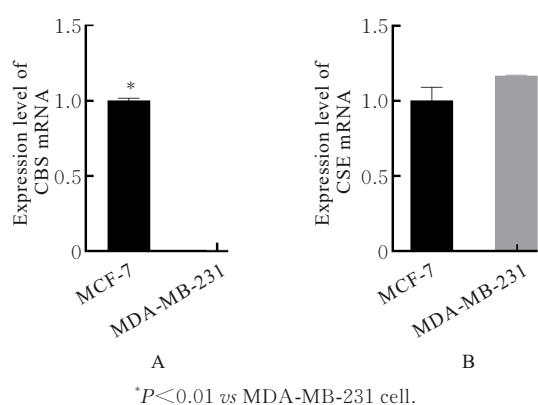
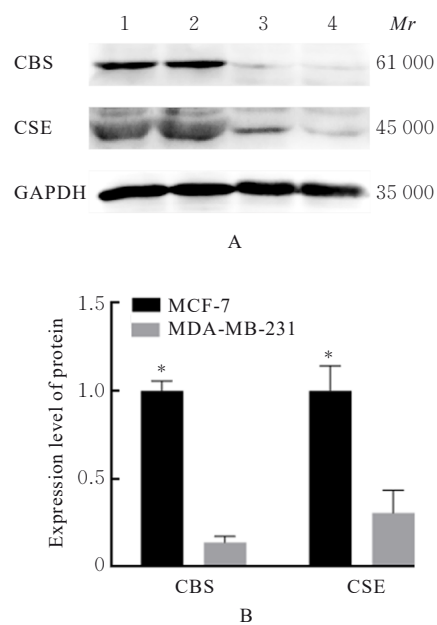


图3 MCF-7和MDA-MB-231细胞中CBS(A)及CSE(B)mRNA表达水平

Fig. 3 Expression levels of CBS (A) and CSE (B) mRNA in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

的mRNA和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。见图5和6。采用RT-qPCR和Western blotting实验验证过表达CSE转染比例,结果显示:在质粒用



Lane 1, 2: MCF-7 cells; Lane 3, 4: MDA-MB-231 cells. * $P < 0.01$ vs MDA-MB-231 cells.

图4 Western blotting法检测MCF-7和MDA-MB-231细胞中CBS及CSE蛋白表达电泳图(A)以及直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of CBS and CSE proteins in MCF-7 and MDA-MB-231 cells detected by Western blotting method

量(μg): Lipo8000™ (μL)为1:1.6转染比例下,MDA-MB-231细胞中CSE表达水平最高 ($P < 0.01$)。见图7和8。

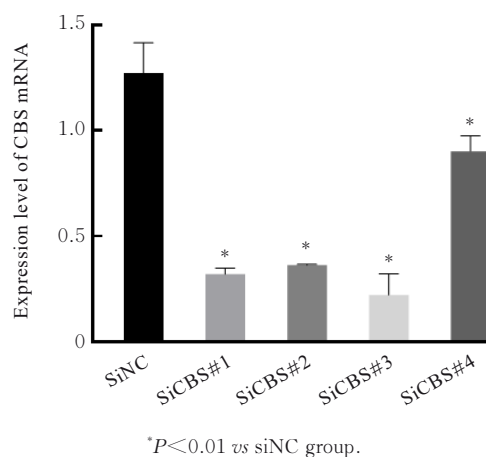
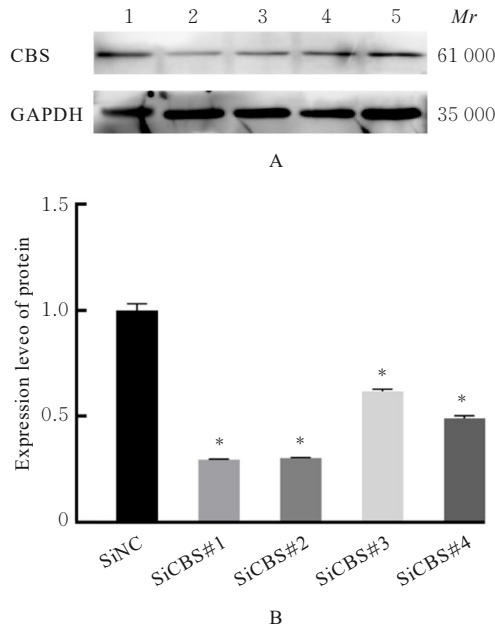


图5 RT-qPCR法检测MCF-7细胞中CBS的敲低效率

Fig. 5 Knockdown efficiencies of CBS in MCF-7 cells detected by RT-qPCR method

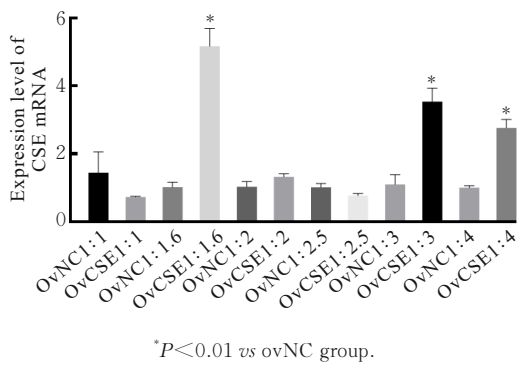
2.4 各组乳腺癌细胞的增殖活性 CCK-8法检测结果显示:与siNC组比较,siCBS组MCF-7细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。见图9。与ovNC组



Lane 1: SiNC group; Lane 2: SiCBS#1 group; Lane 3: SiCBS#2 group; Lane 4: SiCBS#3 group; Lane 5: SiCBS#4 group. * $P < 0.01$ vs siNC group.

图6 Western blotting法检测敲低CBS后各组MCF-7细胞中CBS蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of CBS proteins in MCF-7 cells in various groups after CBS knockdown detected by Western blotting method



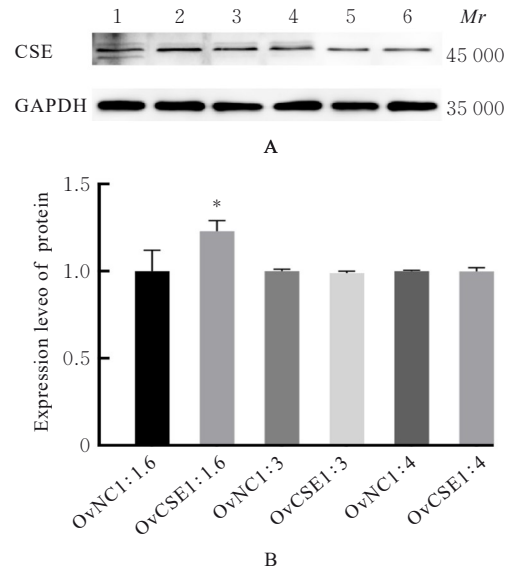
* $P < 0.01$ vs ovNC group.

图7 RT-qPCR法验证MDA-MB-231细胞中CSE过表达质粒的转染比例

Fig. 7 Transfection ratios of CSE over-expression plasmid in MDA-MB-231 cells verified by RT-qPCR method

比较, ovCSE组MDA-MB-231细胞增殖活性明显增强 ($P < 0.01$)。见图10。提示干预CBS和CSE的表达可以影响乳腺癌细胞的增殖。

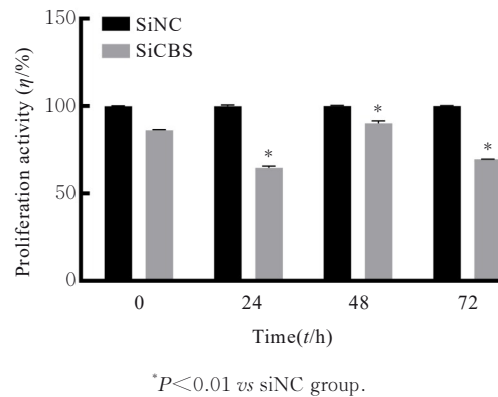
2.5 各组乳腺癌细胞中迁移和侵袭细胞数 Transwell小室实验检测结果显示: 与siNC组比



Lane 1: OvNC1:1.6 group; Lane 2: OvCSE1:1.6 group; Lane 3: OvNC1:3 group; Lane 4: OvCSE1:3 group; Lane 5: OvNC1:4 group; Lane 6: OvCSE1:4 group. * $P < 0.05$ vs ovNC group.

图8 Western blotting法检测过表达CSE后各组MDA-MB-231细胞中CSE蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of CSE protein in MDA-MB-231 cells in various groups after over-expressing CSE detected by Western blotting method



* $P < 0.01$ vs siNC group.

图9 敲低CBS后2组MCF-7细胞的增殖活性

Fig. 9 Proliferation activities of MCF-7 cells in two groups after knockdown of CBS

较, siCBS组MCF-7细胞迁移和侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$)。见图11和12。与ovNC组比较, ovCSE组MDA-MB-231细胞迁移和侵袭细胞数增加 ($P < 0.05$)。见图13和14。提示CBS和CSE可以调控乳腺癌细胞的迁移和侵袭。

2.6 各组乳腺癌细胞中EMT相关蛋白表达水平 在MCF-7细胞中, 与siNC组比较, siCBS组

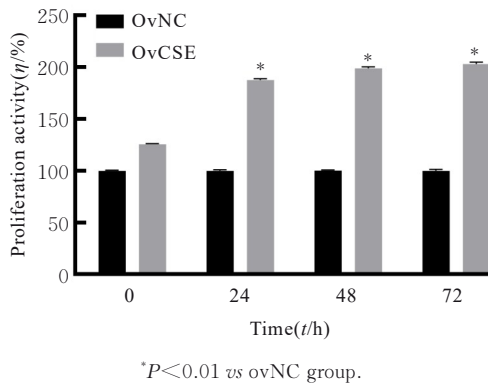


图10 过表达CSE后2组MDA-MB-231细胞的增殖活性

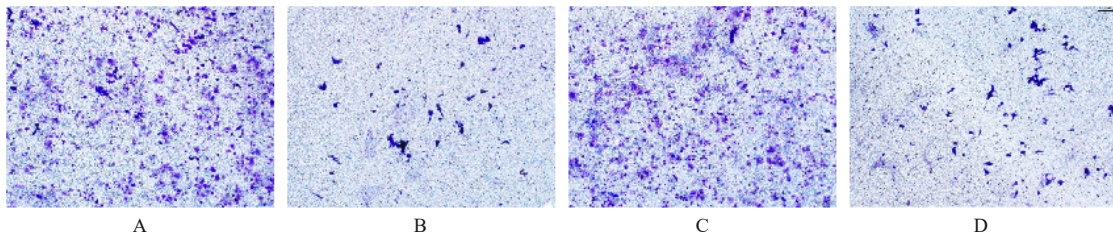
Fig. 10 Proliferation activities of MDA-MB-231 cells in two groups after over-expressing CSE

MCF-7 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见图 15。在 MDA-MB-231 细胞中, 与 ovNC 组比较, ovCSE 组 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)。见图 16。提示 CBS 和 CSE 参与乳腺癌细胞 EMT。

3 讨论

乳腺癌相较于其他癌症治疗方式多样, 早期乳腺癌患者的 5 年生存率较高^[4]。基因突变或基因表达的改变是导致乳腺癌转移的主要原因^[2]。许多药物在乳腺癌中具有应用前景, 但单独或者联合用药时, 总体效果较差^[9]。因此寻找乳腺癌新的治疗靶点至关重要。

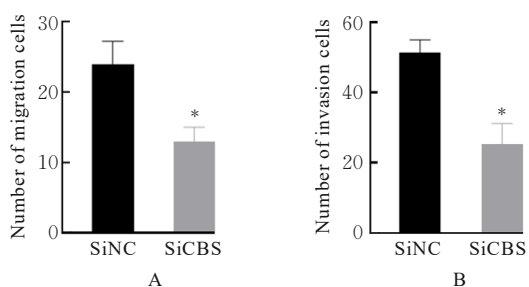
在多种癌症类型中发现了 H₂S 合成酶的失调。通过调节 H₂S 合成酶的表达, 改变肿瘤来源 H₂S 水平, 从而改变肿瘤微环境, 影响肿瘤的生长和转移^[10]。在生理条件下, 3-MST 对 H₂S 的贡献较低^[11], 因此本研究选择 CBS 和 CSE 作为研究对象, 结果显示: 在乳腺癌组织中 CBS 和 CSE 的 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高, 且 CBS 在 MCF-7 细胞中高表达, CSE 在 MDA-MB-231 细胞中低表达。因此本研究选择在 MCF-7 细胞中敲低 CBS, 在 MDA-MB-231 细胞中过表达 CSE, 检测调控 H₂S 合成酶蛋白水平后对乳腺癌增殖和迁移能力的影响。本研究结果显示: H₂S 合成酶 CBS 和 CSE 参与了乳腺癌细胞的恶性生物学行为。研究^[12-14]显示: H₂S 合成酶的表达影响肿瘤细胞的增殖和迁移能力。在 HCT116 结肠癌细胞系中敲低



A—B: Migration; C—D: Invasion; A, C: SiNC group; B, D: SiCBS group.

图11 敲低CBS后2组MCF-7细胞迁移和侵袭情况(结晶紫, ×100)

Fig. 11 Migration and invasion of MCF-7 cells in two groups after knockdown of CBS(Crystal violet, ×100)

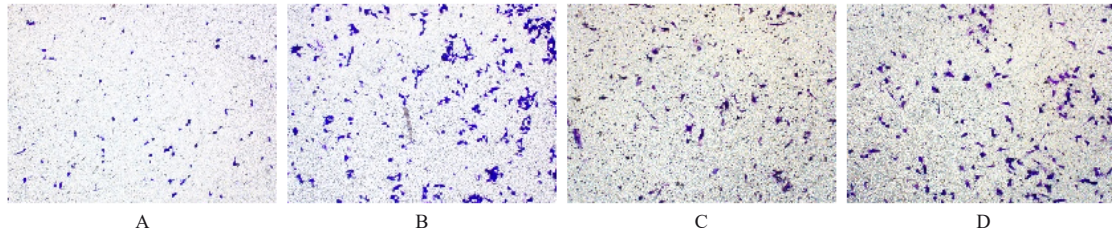


A: Migration; B: Invasion. *P<0.05 vs siNC group.

图12 敲低CBS后2组MCF-7细胞迁移和侵袭细胞数

Fig. 12 Numbers of migration and invasion MCF-7 cells in two groups after knockdown of CBS

CBS 或用氨基氧乙酸 (aminooxyacetic acid, AOA) 进行药物抑制, 细胞增殖和 H₂S 合成减少, 细胞迁移和侵袭能力也被抑制^[12]。CBS 的药理抑制或基因沉默被证明在体外抑制肿瘤的生长和转移^[15]。在人前列腺癌 PC3 细胞中过表达 CSE 增加细胞 H₂S 水平, 增强细胞侵袭、血管生成、淋巴管生成和肿瘤生长转移^[16]。CSE 在肝癌细胞中过表达, 通过磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular regulated kinases, ERK) 1/2 参与肝癌细胞增殖^[17]。作为 H₂S 的合成酶, CBS 和 CSE 蛋白表达



A-B:Migration; C-D:Invasion; A,C:OvNC group; B,D:OvCSE group.

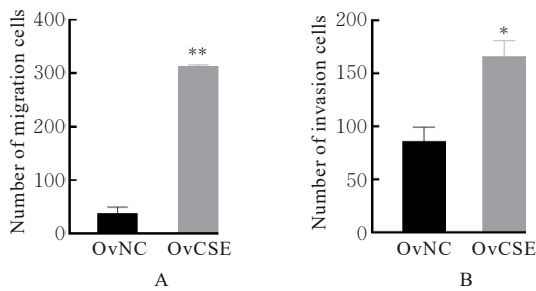
图 13 过表达 CSE 后 2 组 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭情况(结晶紫, $\times 100$)Fig. 13 Migration and invasion of MDA-MB-231 cells in two groups after over-expression of CSE (Crystal violet, $\times 100$)A:Migration;B:Invasion. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ovNC group.

图 14 过表达 CSE 后 2 组 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭细胞数

Fig. 14 Numbers of migration and invasion cells of MDA-MB-231 cells in two groups after over-expression of CSE

水平改变的同时, 细胞内源性 H_2S 水平可能也发生相应变化。

EMT 是肿瘤转移是关键过程, EMT 是极化的上皮细胞通过多种生化改变, 导致间质表型的生物学过程^[18]。E-cadherin 等上皮蛋白表达水平的下调, N-cadherin 和 Vimentin 等间充质蛋白表达水平升高, 是 EMT 发生的标志^[19-20]。转移是导致乳腺癌高死亡率的主要原因, 转移性乳腺癌主要通过 EMT 从肿瘤微环境中获得侵袭性^[21]。研究^[22]显示: 在 HepG2 细胞中敲低 CSE, 明显降低辐射诱导的 EMT 相关蛋白表达水平升高。 H_2S 合成酶的抑制导致结肠癌细胞中 ATP 柠檬酸裂解酶 (ATP citrate lyase, ACLY) 活性被抑制, 进而诱导 EMT 向间充质-上皮转化 (mesenchymal-epithelial transition, MET) 转变^[23]。因此本研究探索了 H_2S 合成酶对乳腺癌 EMT 的影响, 结果显示: 敲低 CBS 后, E-cadherin 蛋白表达水平升高, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平降低, 而过表达 CSE 呈现的结果与之相反, 表明 H_2S 合成酶表达水平升高

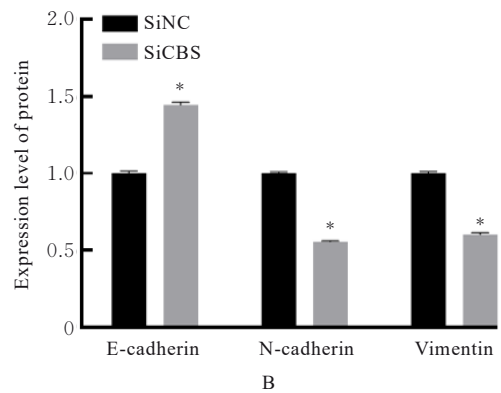
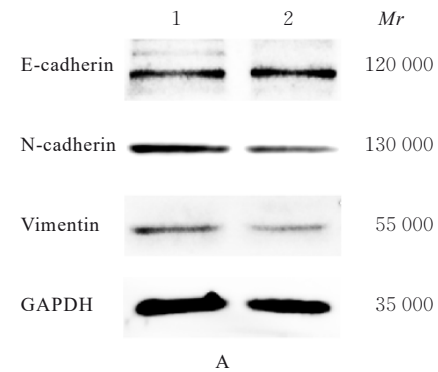
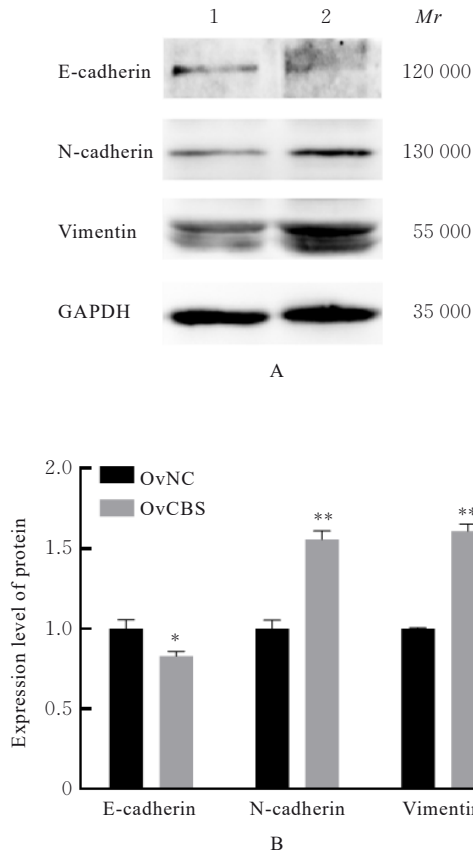
Lane 1: SiNC group; Lane 2: SiCBS group. * $P < 0.01$ vs siNC group.

图 15 Western blotting 法检测敲低 CBS 后 2 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 15 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in MCF-7 cells in two groups after CBS knockdown detected by Western blotting method

可以促进乳腺癌 EMT。

综上所述, CBS 和 CSE 在乳腺癌组织中高表达, 高水平的 CBS 和 CSE 可以促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT, 进而促进乳腺癌的生



Lane 1: OvNC group; Lane 2: OvCSE group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ovNC group.

图16 Western blotting法检测过表达CSE后2组MDA-MB-231细胞中E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 16 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in MDA-MB-231 cells in two groups after over-expression of CSE detected by Western blotting method

长和转移。H₂S合成酶可能为乳腺癌的治疗提供新的靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

赵蒙蒙参与课题设计、数据整理和论文撰写,王雅璐、许宇翔和杨凯歌参与实验操作过程,曹玉文和周文虎参与论文审校,费晶参与组织样本的收集,王雯、罗成华和胡建明参与指导课题设计和论文撰写。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global

Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

- [2] HUPPERT L A, GUMUSAY O, IDOSSA D, et al. Systemic therapy for hormone receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative early stage and metastatic breast cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(5): 480-515.
- [3] AGOSTINETTO E, GLIGOROV J, PICCART M. Systemic therapy for early-stage breast cancer: learning from the past to build the future [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(12): 763-774.
- [4] ZOU Y, YE F, KONG Y, et al. The Single-Cell Landscape of Intratumoral Heterogeneity and The Immunosuppressive Microenvironment in Liver and Brain Metastases of Breast Cancer [J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 10(5): 2203699.
- [5] POZZI G, GOBBI G, MASSELLI E, et al. Buffering Adaptive Immunity by Hydrogen Sulfide [J]. Cells, 2022, 11(3): 325.
- [6] SHACKELFORD R E, MOHAMMAD I Z, MERAM A T, et al. Molecular Functions of Hydrogen Sulfide in Cancer[J]. Pathophysiology, 2021, 28(3): 437-456.
- [7] YOUNESS R A, ASSAL R A, ABDEL MOTAAL A, et al. A novel role of sONE/NOS3/NO signaling cascade in mediating hydrogen sulphide bilateral effects on triple negative breast cancer progression [J]. Nitric Oxide, 2018, 80: 12-23.
- [8] LI M, LIU Y, DENG Y, et al. Therapeutic potential of endogenous hydrogen sulfide inhibition in breast cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2021, 45(5): 68.
- [9] ONKAR S S, CARLETON N M, LUCAS P C, et al. The Great Immune Escape: Understanding the Divergent Immune Response in Breast Cancer Subtypes[J]. Cancer Discov, 2023, 13(1): 23-40.
- [10] GIUFFRÈ A, TOMÉ C S, FERNANDES D G F, et al. Hydrogen Sulfide Metabolism and Signaling in the Tumor Microenvironment [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1219: 335-353
- [11] MASI A D, ASCENZI P. H₂S: A "Double face" molecule in health and disease[J]. BioFactors, 2013, 39(2): 186-196.
- [12] SZABO C, COLETTA C, CHAO C, et al. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-β-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(30): 12474-12479.
- [13] WANG M, YAN J, CAO X, et al. Hydrogen sulfide

- modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via HIF-1 α activation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 172: 113775.
- [14] JIANG Q Y, LI J M, JING M R, et al. Cystathionine- β -Synthase Regulates the proliferation, migration, and invasion of thyroid carcinoma cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8678363.
- [15] HELLMICH M R, SZABO C. Hydrogen sulfide and cancer[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 230: 233-241.
- [16] WANG Y, HUANG J, CHEN W, et al. Dysregulation of cystathionine- γ -lyase promotes prostate cancer progression and metastasis[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(10): e45986.
- [17] PAN Y, YE S, YUAN D, et al. Hydrogen sulfide (H₂S)/cystathionine- γ -yase (CSE) pathway contributes to the proliferation of hepatoma cells [J]. *Mutat Res*, 2014(763-764): 10-18.
- [18] 杨钰萌, 王 新, 麻 婧. M1/M2型巨噬细胞在肝纤维化中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(6): 726-732.
- [19] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [20] GONZALEZ D M, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344). DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- [21] PARK M, KIM D, KO S, et al. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6806.
- [22] ZHANG H, SONG Y, ZHOU C, et al. Blocking endogenous H₂S signaling attenuated radiation-induced long-term metastasis of residual HepG2 cells through inhibition of EMT[J]. *Radiat Res*, 2018, 190(4): 374.
- [23] ASCENÇÃO K, DILEK N, AUGSBURGER F, et al. Pharmacological induction of mesenchymal-epithelial transition via inhibition of H₂S biosynthesis and consequent suppression of ACLY activity in colon cancer cells[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105393.