

KRT14 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进基底细胞样乳腺癌侵袭和迁移

程政¹, 张曼曼¹, 周静妮², 郭欠影^{1,2}, 吴正升^{1,2}

(¹ 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032;

² 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022)

摘要 **目的** 探讨角蛋白 14(KRT14)在基底细胞样乳腺癌(BLBC)中的表达及其生物学功能和机制。**方法** 通过 TCGA 数据库分析 KRT14 mRNA 在 BLBC 与正常乳腺组织中的表达水平。采用 qPCR、Western blot (WB) 和免疫组化检测 KRT14 在 BLBC 和癌旁非肿瘤乳腺组织中的表达,并分析其与临床病理特征的关系。在乳腺癌细胞中分别构建 KRT14 过表达和敲低模型,使用细胞划痕和 Transwell 实验评估乳腺癌细胞迁移和侵袭能力变化。通过 WB 和免疫荧光检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 β -连环蛋白(β -catenin)、无翼型 MMTV 整合位点家族成员 1(Wnt1)、基质金属蛋白酶 7(MMP7)和细胞性骨髓细胞增生病毒癌基因同源物 1(c-Myc)的表达和 β -catenin 的细胞定位,并使用 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂验证 KRT14 的作用机制。**结果** KRT14 在 BLBC 组织中表达高于正常组织或癌旁非肿瘤乳腺组织($P < 0.05$),并与 T 分期和组织学分级呈正相关($P < 0.05$)。KRT14 过表达能够增强乳腺癌细胞迁移和侵袭能力,反之则减弱($P < 0.01$)。KRT14 过表达能够增加 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 β -catenin、Wnt1、MMP7 和 c-Myc 的表达水平,并且抑制该通路后可消除 KRT14 对细胞迁移和侵袭的影响。**结论** KRT14 在基底细胞样乳腺癌中高表达,可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与了乳腺癌细胞迁移和侵袭。

关键词 KRT14;乳腺癌;Wnt/ β -catenin 信号通路;基底细胞样乳腺癌;迁移;侵袭

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A

乳腺癌作为全球女性群体中最为常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈现逐年上升的趋势,对女性健康构成了极为严重的威胁^[1]。基底细胞样乳腺癌(basal-like breast cancer, BLBC)是一种具有高度侵袭性的乳腺癌亚型,占有乳腺癌的 15% ~ 20%,由于其高度侵袭性和较强的转移能力^[2],BLBC 患者的预后极差,5 年生存率通常低于 30%^[3]。因此深入探究 BLBC 迁移和侵袭的分子机制,对于提高治疗效果以及改善患者预后有着重要意义。

角蛋白是一类重要的结构蛋白,在上皮细胞的分化、增殖和迁移中发挥关键作用。有研究^[4]表明角蛋白的表达和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)密切相关,部分角蛋白被用作癌症诊断和预后的生物标志物^[5]。角蛋白 14(keratin14, KRT14)是角蛋白家族成员之一,目前 KRT14 在乳腺癌尤其是 BLBC 中的相关研究仍较少,其生物学功能和机制尚不明确。该研究旨在探究

KRT14 在 BLBC 中的表达情况及其对 BLBC 细胞迁移和侵袭的影响和分子机制,为开发新的治疗靶点提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及主要材料 研究 BLBC 功能时常用的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均为阴性的 HCC1937 和 MDA-MB-231 细胞为研究对象。人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A,人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 HCC1937,以及人胚肾细胞系 293T 均购自美国 ATCC 公司;RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基均购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自长沙 CB 公司;PBS、0.25% 胰蛋白酶、即用型液体 DAPI、微丝绿色荧光探针、组织 RNA 稳定保存液和 RIPA 裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;角蛋白 14(keratin 14, KRT14)(货号:82824-1-RR)、GAPDH(货号:60004-1-Ig)、 β -连环蛋白(catenin Beta 1, β -catenin)(货号:51067-2-AP)、无翼型 MMTV 整合位点

2025-02-01 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82473059)

作者简介:程政,男,硕士研究生;

吴正升,男,教授,博士生导师,通信作者, E-mail:

wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

家族成员 1 (wingless-type MMTV integration site family, member 1, Wnt1) (货号: 27935-1-AP)、基质金属蛋白酶 7 (matrix metalloproteinase 7, MMP7) (货号: 10374-2-AP) 和细胞性骨髓细胞增生病毒癌基因同源物 1 (cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-Myc) (货号: 10828-1-AP) 一抗、山羊抗鼠 (货号: SA00001-1) 和山羊抗兔 (货号: SA00001-2) 二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司; ECL 显影液购自美国 Cytiva 公司 (货号: RPN2020D); DyLight594 荧光二抗 (货号: SA1107) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 反转录试剂盒 (货号: AE301-03) 和 qPCR 试剂盒 (货号: AQ132-11) 均购自北京全式金生物技术有限公司; 3-[[(4-甲基苯基) 磺酰基] 氨基] 苯甲酸甲酯 (Methyl 3-[[(4-methylphenyl) sulfonyl] amino] benzoate, MSAB) (货号: HY-120697) 购自美国 MCE 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司 (货号: 355899); 免疫组化试剂 (包括试剂盒, 货号: KIT-9903、柠檬酸盐, 货号: MVS-0066、PBS 磷酸盐缓冲剂, 货号: PBS-0061、DAB 显色试剂盒, 货号: DAB-1031、苏木精染液, 货号: CTS-1091) 均购自福州迈新生物技术开发有限公司; 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 配胶试剂盒 (货号: PG114)、快速封闭液 (货号: PS108P)、PMSF (货号: GRF101) 均购自上海雅酶生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器 细胞计数仪 (型号: JIMBIO FIL, 江苏卓微生物科技有限公司)、倒置显微镜 (型号: Axiovert 200, 德国卡尔·蔡司公司)、CO₂ 恒温恒湿培养箱 (型号: IC050, 德国美墨尔特公司)、电脑生物组织脱水机、组织包埋机、恒温摊烤片机 (型号: HT-12A、HB-L2、HK-4, 武汉汉谷医疗科技有限公司)、转轮式切片机 (型号: Minux S700, 深圳瑞沃德生命科技股份有限公司)、脱色摇床 (型号: ZHWY-344, 上海智城分析仪器制造有限公司)、电泳仪 (型号: DYY-6C, 北京市六一仪器厂)、正置显微镜 (型号: CX22, 日本奥林巴斯公司)、倒置荧光显微镜 (型号: TS100, 日本尼康公司)、PCR 扩增仪 (型号: EDC810, 广州东胜生物科技有限公司)、荧光显微镜 (型号: LSM980, 德国卡尔蔡司公司)、台式微量离心机、台式高速冷冻离心机 (型号: Microfuge 16、Allegra x-22R, 美国贝克曼库尔特公司)、精密 PH 仪 (型号: PHS-3C, 梅特勒-托利多公司)、化学发光成像系统 (型号: Tanon 5200, 上海天能科技有限公司)、多功能酶标仪 (enspire, 美国珀金埃尔默公司)、荧光定量 PCR 仪 (型号: cfx96, 美国伯乐公司)。

1.1.3 临床样本 收集安徽医科大学第一附属医院 2014 年 12 月至 2024 年 12 月期间 87 例 BLBC 患者组织和对应的癌旁非肿瘤乳腺组织 (距肿瘤病灶 2 cm 以上的癌旁组织), 并整理相关临床病理资料。另收集 10 对新鲜 BLBC 患者组织和对应的癌旁非肿瘤乳腺组织, 标本离体后, 尽快将组织切成直径为 0.5 cm 左右的组织块, 放入组织 RNA 稳定保存液中后放置于 -20 ℃ 冰箱备用。纳入标准为: ① 所有病例均经组织病理学明确为 BLBC 亚型; ② 术前未进行抗肿瘤治疗, 手术切除完整病变并具有明确的术后病理组织学诊断结果; ③ 患者病历资料完整。本研究涉及所有患者均已签署知情同意书, 实验开始前所有实验步骤已由安徽医科大学第一附属医院伦理审查委员会批准 (伦理批号: 2024284)。

1.2 方法

1.2.1 公共数据库分析 从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库下载乳腺组织的 RNA-seq 表达数据, 筛选有 ER、PR、HER-2、增殖细胞核抗原 Ki-67 (marker of proliferation Ki-67, Ki-67) 以及细胞角蛋白 5/6 (cytokeratin 5/6, CK5/6) 表达数据的病例, 将样本分为 Luminal A 型、Luminal B 型、HER-2 过表达型、基底细胞样型和正常组织五组, 将 KRT14 mRNA 的表达数据归一化处理后, 用 GraphPad Prism 10 绘制散点图。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) TRIzol 法提取细胞或组织 RNA 后使用反转录试剂盒逆转录为 cDNA, 将 cDNA 稀释 10 倍后按说明书向八联管中添加荧光染料和引物体系后放入 qPCR 仪中反应。所使用引物序列如下: GAPDH, 正向 5'-GCTGGAGGAGGAGATCGACA-3', 反向 5'-CAGCTCCTTCAGGACACGG-3'; KRT14, 正向 5'-TTTGGCGGCTGGAGGAGGTCACA-3', 反向 5'-ATCGCCACCTACCGCCGCCTG-3'; β -catenin, 正向 5'-GCTTTCAGTTGAGCTGACCA-3', 反向 5'-CAAGTCCAAGATCAGCAGTCTC-3'。

1.2.3 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 实验 用 RIPA 裂解液和 PMSF 溶液 (100 : 1) 配制裂解液提取细胞或组织总蛋白。在 SDS-PAGE 凝胶电泳过程中以 80 V 电压, 持续约 30 min 后将电压提高到 120 V 持续 1 ~ 2 h, 而后在恒流 225 mA 的条件下转膜约 90 min, 再使用 1 × 快速封闭液室温封闭 20 min, 随后用特异性一抗按 KRT14 (1 : 2 000)、GAPDH (1 : 10 000)、 β -catenin (1 : 5 000)、Wnt1 (1 : 500)、MMP7 (1 : 1 000) 和 c-Myc (1 : 4 000) 与一抗稀释液

配制,4℃孵育过夜。次日洗膜后室温孵育山羊抗兔(1:10 000)二抗1 h,再次洗膜后使用ECL显影液显影。

1.2.4 免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 组织经固定、脱水、透明、包埋制成石蜡包埋组织,后切成3~4 μm的石蜡切片。采用EnVision两步法检测KRT14在乳腺细胞癌组织中的表达水平,依次烤片、脱蜡水化、枸橼酸盐高压修复、过氧化氢酶阻断剂封闭、一抗KRT14(1:400)过夜孵育、次日复温后用PBS冲洗并滴加羊抗兔HRP二抗(即用型)孵育、DAB显色、苏木精染色、脱水透明、中性树胶封固。按照说明书选用已知人食管癌组织染色切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。由两位高年资病理医师采用双盲法阅片。KRT14阳性染色评分标准以细胞质和细胞膜的着色强度及着色细胞数综合判断。①按阳性细胞着色强度计分:未着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;②按阳性细胞百分比计分:无阳性细胞为0分,阳性细胞数<25%为1分,25%~50%为2分,>50%为3分。将两项得分结果相加作为最终评分:<3分为低表达,≥3分为高表达^[6]。

1.2.5 细胞培养 实验细胞选用ER、PR、HER-2均为阴性的HCC1937细胞和MDA-MB-231细胞,HCC1937细胞在含有10%胎牛血清和1%青-链霉素混合液的RPMI 1640培养基中进行培养,而MDA-MB-231、293T和MCF-10A细胞则在含有10%胎牛血清和1%青-链霉素混合液的DMEM培养基中进行培养。上述细胞在37℃、5%CO₂浓度下于细胞培养箱中进行培养并传代两次,待细胞状态稳定后用于后续实验。

1.2.6 稳转细胞系的构建 从武汉森灵生物科技公司购买敲低质粒shKRT14(shKRT14#1和shKRT14#2)和阴性对照(sh-Ctrl)、过表达质粒KRT14(oe-KRT14)和阴性对照质粒(oe-Ctrl)。shKRT14序列如下,shKRT14-1:5'-CCGGGCAGTGACATCTA-TCAAGTTTCTCGAGAACTTGATAGATGTCAGTCT-TTTTTG-3';shKRT14-2:5'-CCGGGCACAGTGACAT-CTATCAAGTTTCTCGAGAACTTGATAGATGTCAGTCTGTGCTTTTTT-3'。将11.25 μg目的质粒、3.75 μg pMD2G、7.5 μg psPAX2,混合均匀后加入330 μl 0.1×TE溶液,56.5 μl氯化钙溶液,加无菌水至570 μl;再缓慢逐滴加入570 μl HBS溶液,室温静置15 min;最后将混合液缓慢逐滴加入293T细胞并摇匀,次日收集病毒上清液并使用0.22 μm滤膜过滤后,

分别感染MDA-MB-231细胞和HCC1937细胞,并使用嘌呤霉素筛选成功表达目标基因的细胞。最后收集上述稳转细胞系使用WB实验检测转染效率,继续培养稳转细胞后用于后续实验。

1.2.7 划痕实验 将乳腺癌细胞经过胰酶消化后重悬,均匀地铺在6孔板中,待细胞贴壁密度达到90%以上后使用10 μl无菌枪头进行划痕处理,在PBS清洗细胞之后,更换无血清培养基并进行拍照记录作为0 h对照。24 h后取出细胞,在显微镜下观察同一位置拍照记录。

1.2.8 免疫荧光实验 将HCC1937稳转oe-KRT14和oe-Ctrl细胞接种于细胞爬片上,待细胞贴壁后用4%多聚甲醛固定细胞1 h,然后用0.1% Triton X-100通透细胞膜15 min,用5% BSA作为封闭液室温封闭1 h;随后,加入β-catenin一抗(1:5 000)4℃孵育过夜,次日用DyLight594荧光二抗(1:400)孵育1 h(如染的是细胞骨架,则只需要用荧光标记的鬼笔环肽染色1 h即可);最后,用DAPI染色细胞核5 min,以上步骤之间都需要用PBS洗3遍,每遍5 min,最后用抗荧光淬灭封片剂封片,通过共聚焦荧光显微镜观察。

1.2.9 Transwell实验 将表达目的基因的稳转细胞进行细胞饥饿处理12~24 h后,经过胰酶消化,用无血清培养基制成每毫升5×10⁵个细胞的细胞悬液。在24孔板中加入600 μl完全培养基,加入小室接种200 μl细胞悬液。Transwell侵袭实验提前1 h在小室中铺上60 μl稀释后的Matrigel基质胶24 h后取出,4%多聚甲醛固定细胞30 min,0.1%结晶紫染色20 min后用湿棉签擦除小室内的细胞,清洗小室并晾干后拍照留存。

1.2.10 统计学处理 所有实验均独立重复3次。使用GraphPad Prism 10软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以n(%)表示。采用t检验和卡方检验进行两组数据的比较,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组数据的比较,使用Tukey检验进行事后两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KRT14在BLBC组织中的表达量 利用GDC Data Portal下载TCGA数据库中乳腺癌和正常乳腺组织的RNA测序(RNA-Seq)数据,并对比不同分型的乳腺癌样本与正常样本之间KRT14 mRNA的表达水平差异(图1A)。结果显示,KRT14 mRNA

在 BLBC 组织中的表达量明显高于正常组织 ($q = 18.14, P < 0.001$), 而 Luminal A 型、Luminal B 型和 HER-2 过表达型乳腺癌组织与正常乳腺组织中的 KRT14 mRNA 表达水平差异没有统计学意义 (均 $P > 0.05$)。同时, 收集 10 对新鲜 BLBC 组织和癌旁非肿瘤乳腺组织, 通过 qPCR 法检测 KRT14 mRNA 相对表达量, 通过 WB 实验检测 KRT14 蛋白的相对表达量。结果表明, BLBC 组织 KRT14 的 mRNA 和

蛋白相对表达量明显高于癌旁非肿瘤乳腺组织 ($t = 4.73, 4.91$, 均 $P < 0.001$), 图 1B、1C) **2.2 KRT14 在 BLBC 和癌旁非肿瘤乳腺组织中的表达** 通过免疫组化检测 KRT14 在 BLBC 和癌旁非肿瘤乳腺组织的阳性表达, 显示 KRT14 主要定位在细胞质中和细胞膜上, 在肿瘤组织中表达较高, 非肿瘤乳腺组织表达较弱 (图 2)。KRT14 在肿瘤组织中高表达率高于非肿瘤乳腺组织 ($P < 0.05$), 见表 1。

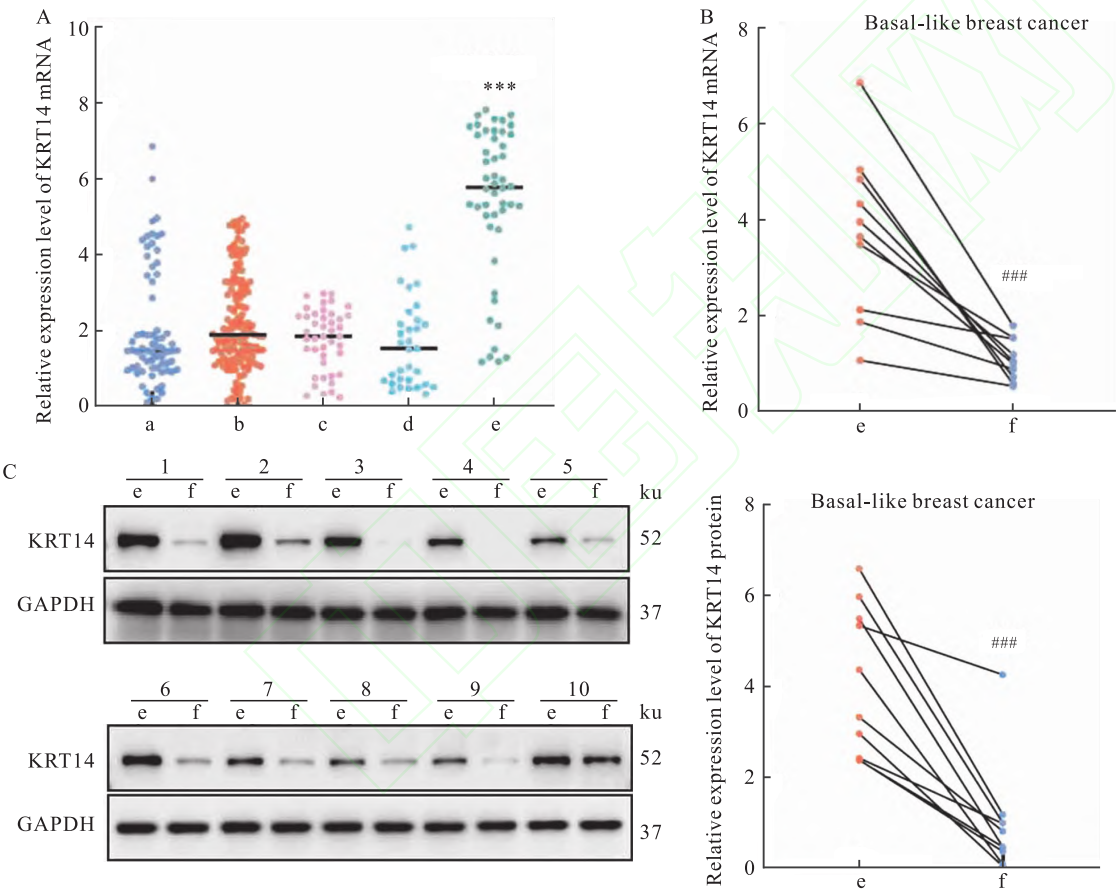


图 1 KRT14 在 BLBC 组织中的表达

Fig.1 The expression of KRT14 in BLBC tissues

A: The relative expression levels of KRT14 mRNA in breast tissue in TCGA public database; B: The relative expression levels of KRT14 mRNA in 10 pairs of clinical BLBC tissues and adjacent non-tumor breast tissues detected by qPCR; C: The relative expression levels of KRT14 protein in 10 pairs of clinical BLBC tissue and adjacent non-tumor breast tissues detected by WB; a: Normal breast tissue group; b: Luminal A breast cancer tissue group; c: Luminal B breast cancer tissue group; d: HER-2 overexpressing breast cancer tissue group; e: BLBC tissue group; f: non-tumor breast tissues group; *** $P < 0.001$ vs normal breast tissue group; ### $P < 0.001$ vs BLBC tissue group.

表 1 KRT14 在基底细胞样乳腺癌和癌旁非肿瘤乳腺组织中的表达 $n(\%)$

Tab.1 The expression of KRT14 in Basal-like Breast Cancer and Adjacent Non-tumor Breast Tissues $n(\%)$

Sample	n	KRT14 protein		χ^2 value	P value
		High expression	Low expression		
Basal-like breast cancer	87	53 (60.92%)	34 (39.08%)	4.521	0.034
Non-tumor breast tissue adjacent to the cancer	87	39 (44.83%)	48 (55.17%)		

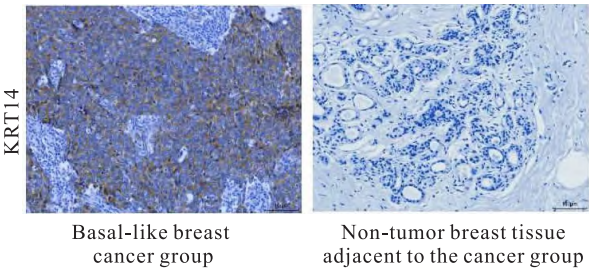


图2 基底细胞样乳腺癌和乳腺良性病变患者 KRT14 的蛋白表达 EnVision 两步法, ×200
Fig. 2 Protein expression of KRT14 in patients with basal-like breast cancer and benign breast lesions EnVision two-step method, ×200

2.3 KRT14 的表达和 BLBC 临床病理特征的关系

分析 KRT14 的高表达和低表达与临床病理特征的相关性, BLBC 组织 KRT14 水平越高肿瘤 T 分期 ($P=0.006$) 以及组织学分级越高 ($P=0.002$), 与患者年龄、是否绝经、病灶位置及 Ki-67 增殖指数无关 ($P>0.05$, 表 2)

2.4 KRT14 对乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力的影响

首先通过 WB 实验检测了乳腺癌细胞

HCC1937 和 MDA-MB-231 的 KRT14 蛋白的表达量 (图 3A), 随后用表达量较低的 HCC1937 ($q=3.25, P<0.05$) 构建了 KRT14 过表达的细胞, 选择表达量较高的 MDA-MB-231 细胞 ($q=21.65, P<0.001$) 构建 KRT14 敲低的细胞, 并用 WB 实验进行表达验证, WB 结果显示: KRT14 敲低的 MDA-MB-231 细胞系构建成功 (sh-KRT14#1 group, $q=5.46, P<0.01$, sh-KRT14#2 group, $q=4.34, P<0.05$, 图 3B), 且 KRT14 过表达的 HCC1937 细胞构建成功 ($t=39.79, P<0.001$, 图 3C)。细胞划痕试验 (图 4A) 结果显示: 与对照组相比, 敲低 KRT14 表达后 MDA-MB-231 细胞的划痕愈合能力明显减弱 ($q=8.37、6.97$, 均 $P<0.05$), 过表达 KRT14 后 HCC1937 细胞的划痕愈合能力增强 ($t=4.80, P<0.01$)。Transwell 实验 (图 4B) 结果显示: 与对照组相比, 敲低 KRT14 表达后 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力减弱 ($q=9.33、7.66$, 均 $P<0.01$), 迁移能力减弱 ($q=10.28、7.69$, 均 $P<0.01$), 过表达 KRT14 后 HCC1937 细胞的迁移能力增强, ($t=6.45, P<0.01$) 侵袭能力增强 ($t=11.44, P<0.001$)。同时,

表 2 基底细胞样乳腺癌 KRT14 表达与患者临床病理特征的关系 n (%)

Clinical pathological parameters	KRT14 protein		χ^2 value	P value
	High expression	Low expression		
Age (years)				
≤35	22(41.51)	12(35.29)	0.384	0.825
36-55	22(41.51)	15(44.12)		
>55	9(16.98)	7(20.59)		
Menopause				
Yes	24(45.28)	14(41.18)	0.142	0.377
No	29(54.71)	20(58.82)		
Location of lesion				
Left breast	29(54.72)	17(50.00)	2.522	0.283
Right breast	21(39.62)	17(50.00)		
Bilateral breasts	3(5.66)	0(0)		
T stage				
T1	18(33.96)	23(67.65)	10.262	0.006
T2	25(47.17)	6(17.65)		
T3-T4	10(18.87)	5(14.7)		
M				
M0	48(90.57)	32(94.12)	0.353	0.552
M1	5(9.43)	2(5.88)		
Histological grade				
I	5(9.43)	12(35.29)	13.012	0.002
II	32(60.38)	20(58.82)		
III	16(30.19)	2(5.88)		
Ki-67 ()				
≤14	19(35.85)	19(55.88)	3.379	0.066
≥14	34(64.15)	15(44.12)		

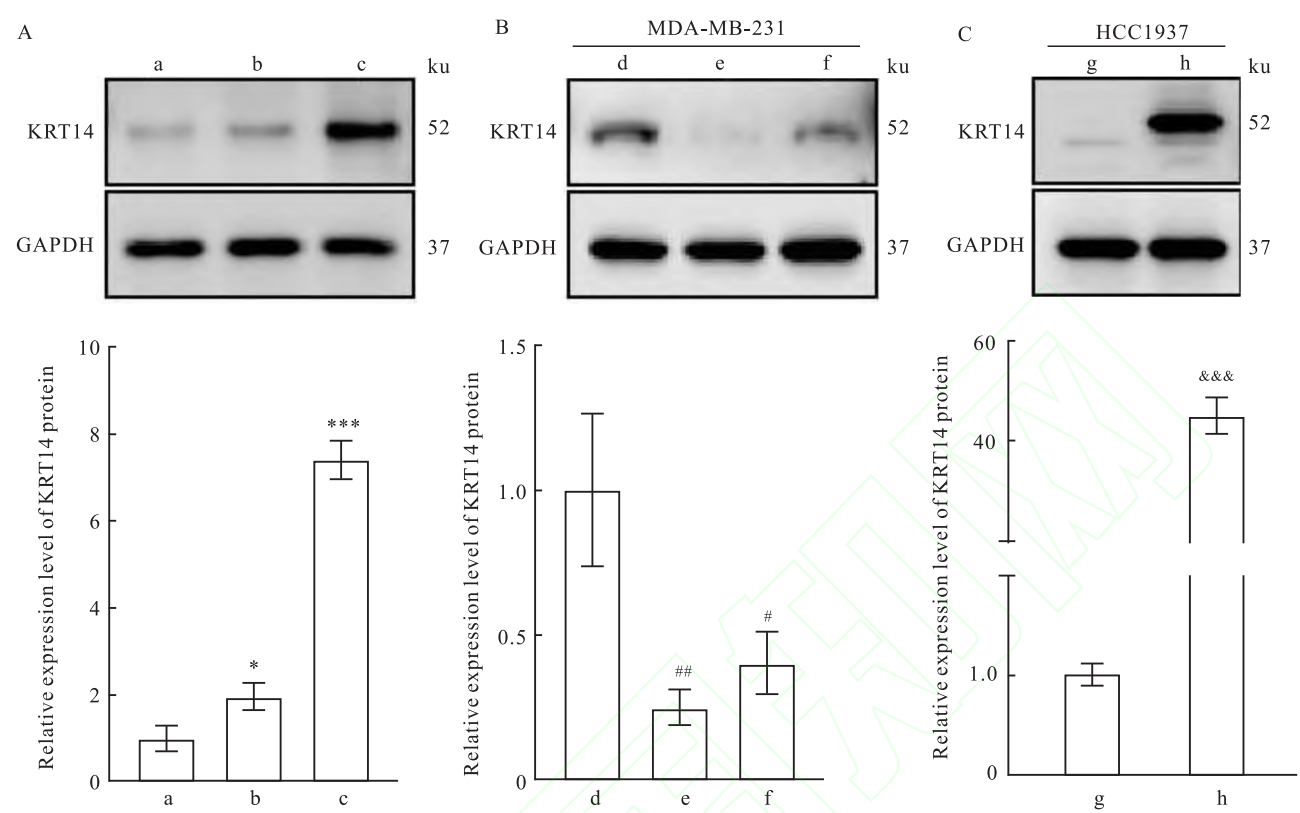


图3 KRT14在基底细胞样乳腺癌细胞中的表达以及稳转细胞系的构建

Fig. 3 The expression of KRT14 in Basal-like Breast Cancer Cells and Construction of Stable Cell Lines

A: WB was used to detect the expression of KRT14 in breast cancer cells; B: WB was used to detect the knockdown effect of *KRT14* in MDA-MB-231 cells; C: WB was used to detect the overexpression efficiency of *KRT14* in HCC1937 cells; a: MCF-10A group; b: HCC1937 group; c: MDA-MB-231 group; d: sh-Ctrl group; e: sh-KRT14#1 group; f: sh-KRT14#2 group; g: oe-Ctrl group; h: oe-KRT14 group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs MCF-10A group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs sh-Ctrl group; &&& $P < 0.001$ vs oe-Ctrl group.

细胞骨架的免疫荧光染色实验结果显示,在HCC1937细胞过表达*KRT14*后细胞呈间充质表型,且呈离散型生长(图4C)。

2.5 KRT14的表达增强 Wnt/ β -catenin 信号通路活性 WB实验结果显示,过表达KRT14的HCC1937细胞中 β -catenin ($t = 8.88, P < 0.001$)、Wnt1 ($t = 8.38, P < 0.01$)、MMP7 ($t = 15.391, P < 0.001$)和c-Myc ($t = 15.60, P < 0.001$)的蛋白质表达水平明显增加(图5A);而在敲低KRT14的MDA-MB-231细胞中 β -catenin ($q = 7.46, 6.70$, 均 $P < 0.05$)、Wnt1 ($q = 9.35, 8.49$, 均 $P < 0.01$)、MMP7 ($q = 8.27, 7.06$, 均 $P < 0.01$)和c-Myc ($q = 9.12, 8.85$, 均 $P < 0.01$)蛋白的表达水平明显下降(图5B)。同时免疫荧光实验结果显示,和对照组相比,KRT14过表达后 β -catenin蛋白在细胞核内的定位明显增多(图5C),以上结果均表明KRT14过表达增强了乳腺癌Wnt/ β -catenin信号通路活性。

2.6 KRT14通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响乳

腺癌细胞的迁移和侵袭 WB实验检测发现在使用Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂MSAB浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时 β -catenin蛋白含量明显降低($q = 9.05, P < 0.01$,图6A),且MSAB浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时 β -catenin蛋白含量与其差异没有统计学意义($q = 0.46, P > 0.05$,图6A),所以选择5 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续MSAB使用浓度。qPCR实验表明,MSAB对 β -catenin mRNA的表达水平无显著影响(均 $P > 0.05$,图6B),提示MSAB主要影响 β -catenin蛋白水平表达。相对于oe-KRT14 + DMSO group,细胞划痕试验结果显示oe-KRT14 + MSAB group的划痕愈合能力明显减弱($q = 15.56, P < 0.001$,图6C),Transwell迁移和侵袭实验显示oe-KRT14 + MSAB group迁移能力减弱($q = 32.24, P < 0.001$,图6D),侵袭能力减弱($q = 27.11, P < 0.001$,图6D),这表明KRT14调控乳腺癌迁移和侵袭能力的机制可能是通过Wnt/ β -catenin信号通路实现的。

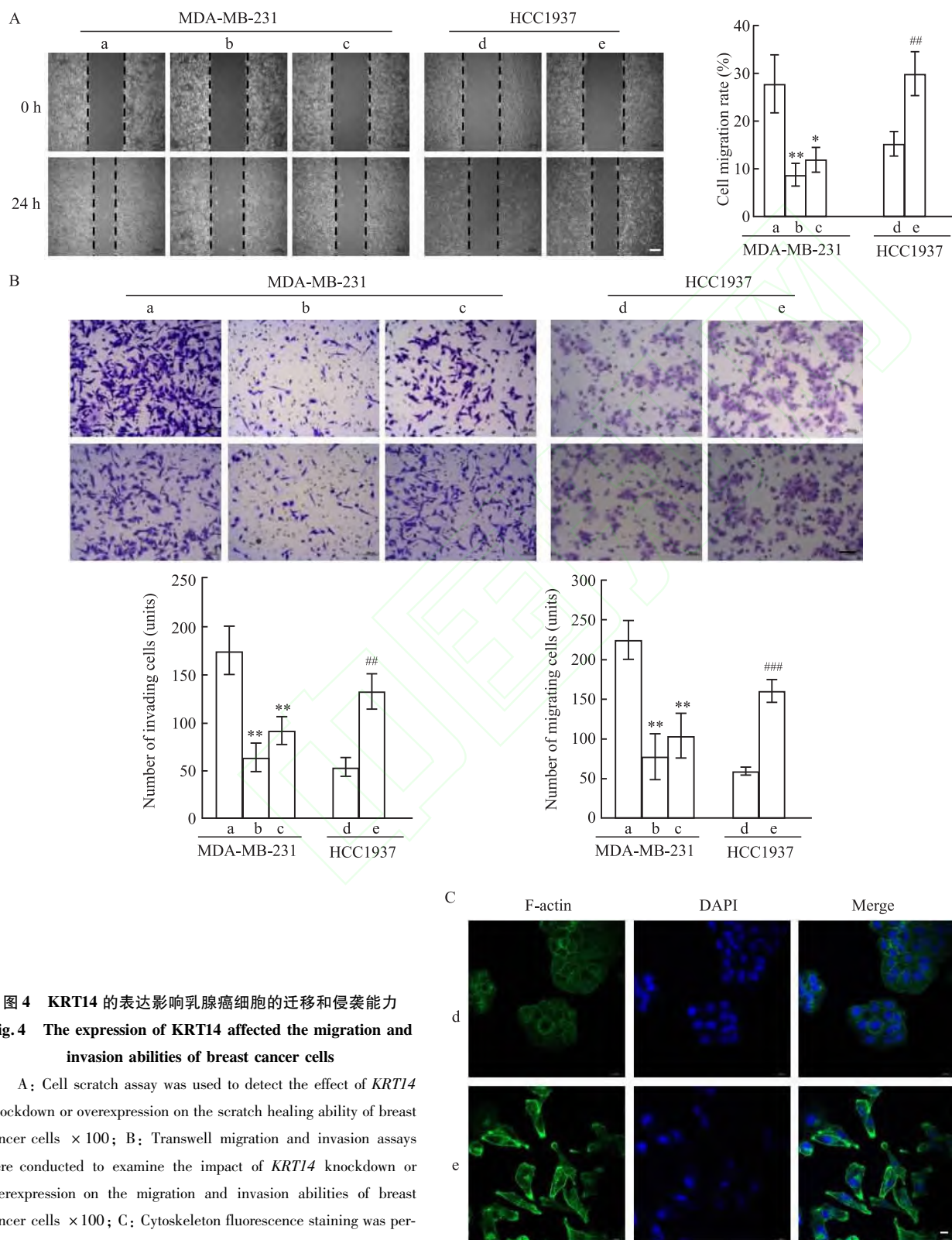


图4 KRT14 的表达影响乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力

Fig. 4 The expression of KRT14 affected the migration and invasion abilities of breast cancer cells

A: Cell scratch assay was used to detect the effect of *KRT14* knockdown or overexpression on the scratch healing ability of breast cancer cells $\times 100$; B: Transwell migration and invasion assays were conducted to examine the impact of *KRT14* knockdown or overexpression on the migration and invasion abilities of breast cancer cells $\times 100$; C: Cytoskeleton fluorescence staining was performed to investigate the effect of *KRT14* overexpression in HCC1937 cells on the cytoskeleton $\times 200$; a: sh-Ctrl group; b: sh-KRT14#1 group; c: sh-KRT14#2 group; d: oe-Ctrl group; e: oe-KRT14 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sh-Ctrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs oe-Ctrl group.

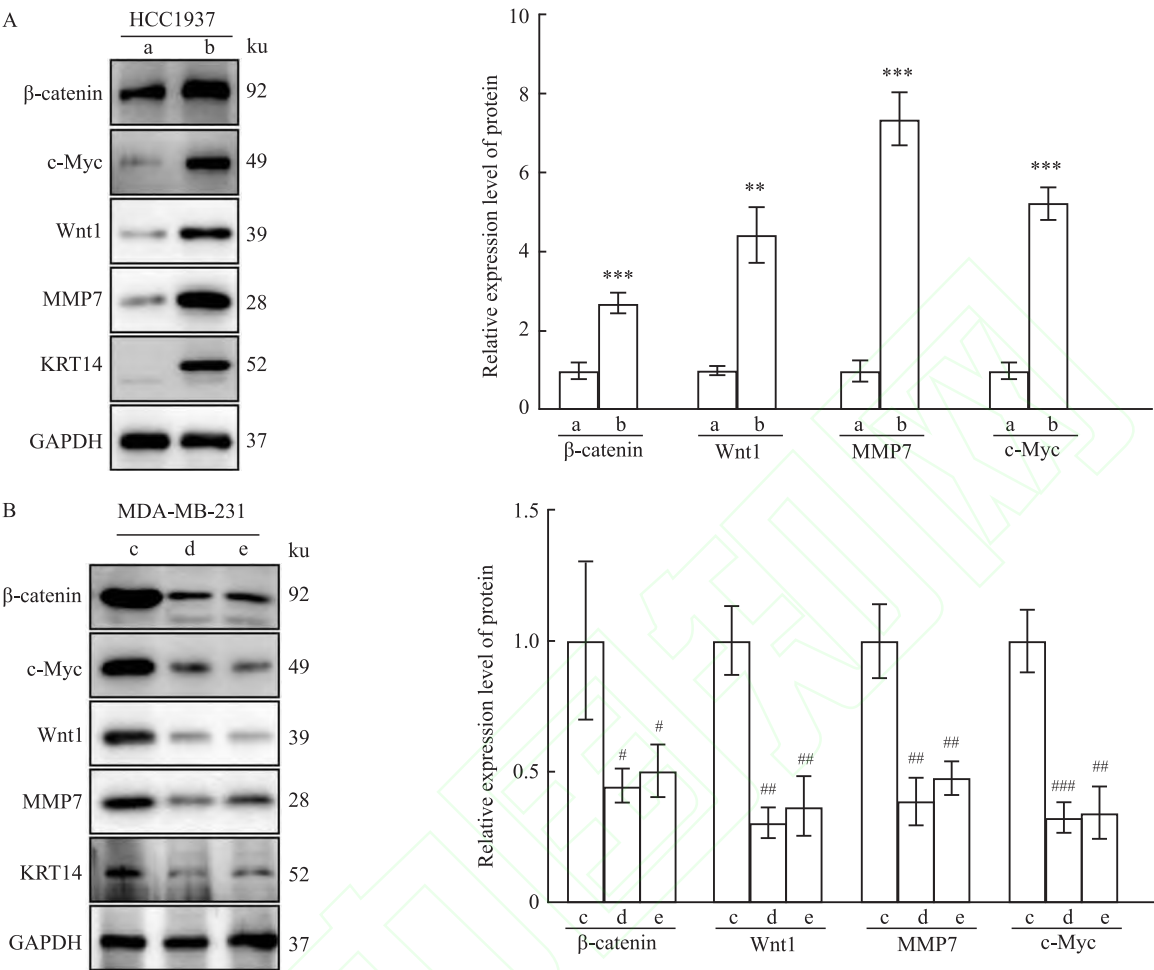


图5 KRT14 的表达增强 Wnt/β-catenin 信号通路活性
Fig.5 KRT14 expression enhanced the activity of the Wnt/β-catenin signaling pathway

A: WB was used to detect the effect of *KRT14* overexpression on the proteins related to the Wnt/β-catenin signaling pathway; B: WB was used to detect the effect of *KRT14* knockdown on the proteins related to the Wnt/β-catenin signaling pathway; C: Immunofluorescence was used to detect the intracellular localization of β-catenin protein after *KRT14* overexpression ×200; a: oe-Ctrl group; b: oe-KRT14 group; c: sh-Ctrl group; d: sh-KRT14 #1 group; e: sh-KRT14 #2 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs oe-Ctrl group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs sh-Ctrl group.

3 讨论

BLBC 是一种高度侵袭性的乳腺癌亚型,通常不表达 ER、PR 和 HER2,而表达 CK5/6、KRT14、EGFR 等基底细胞标志物,由于其独特的分子特征, BLBC 对传统内分泌治疗和靶向 HER2 的治疗反应不佳^[2]。Emens et al^[7] 的研究发现,免疫检查点抑制剂 Pembrolizumab 可以阻断 PD-1 与其配体 PD-L1

和 PD-L2 的结合,在 BLBC 的治疗中发挥着重要作用。Schmid et al^[8] 研究发现,在转移性 PD-L1 阳性 BLBC 患者的长期随访数据中,使用 Atezolizumab 联合紫杉醇作为标准治疗方案的患者有生存获益。然而,目前关于 BLBC 新靶点的研究主要集中在免疫治疗方向,对于 BLBC 相关的生物标志物研究不够深入。

KRT14 是 I 型角蛋白家族的一员,是构成

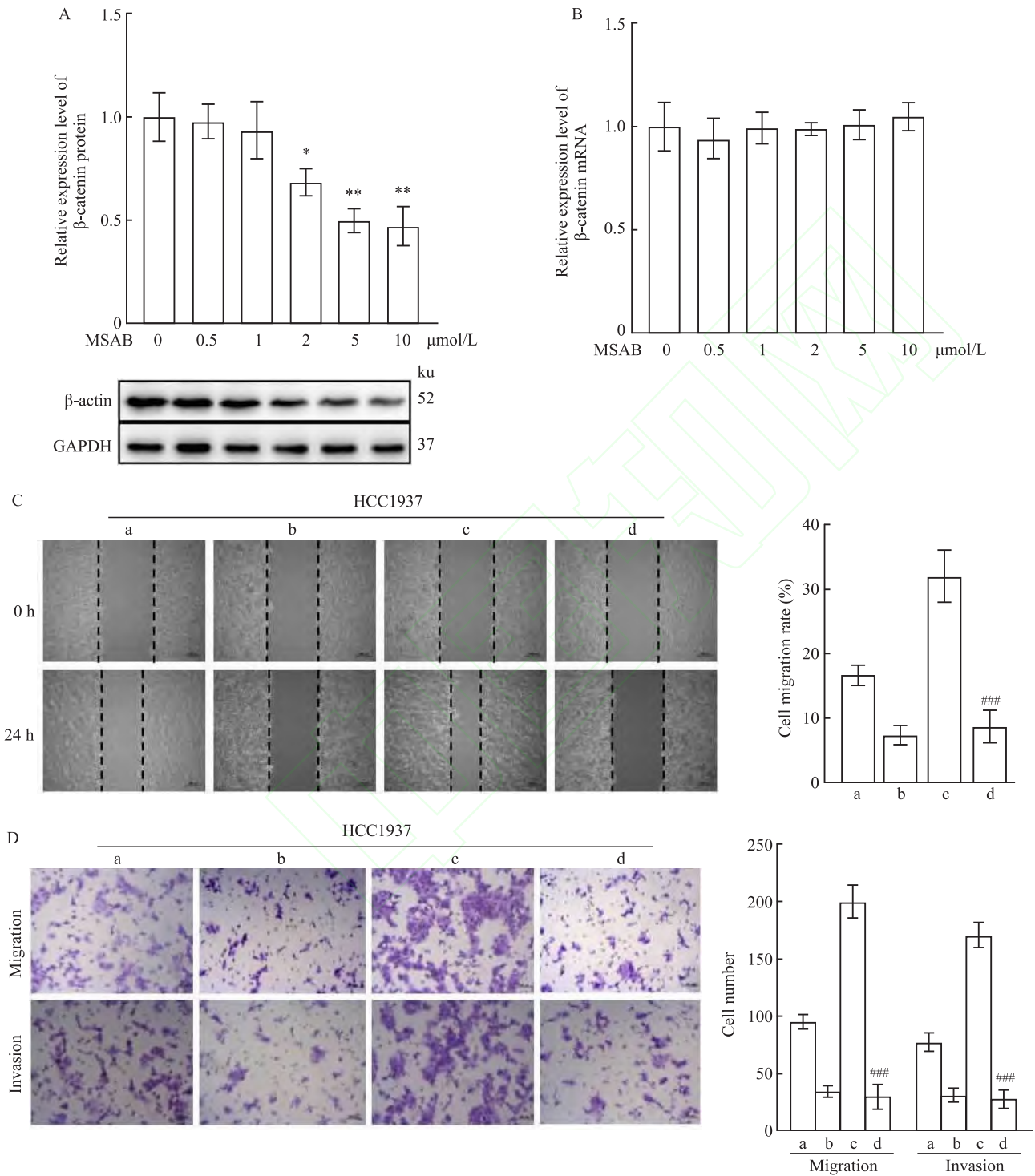


图6 MSAB可以减弱KRT14对乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力的影响

Fig. 6 MSAB weakened the influence of KRT14 on the migration and invasion ability of breast cancer cells

A: WB was used to detect the effect of different concentrations of MSAB on the relative expression level of β -catenin protein in HCC1937 cells; B: qPCR was employed to examine the effect of different concentrations of MSAB on the relative expression level of β -catenin mRNA in HCC1937 cells; C: A cell scratch assay was conducted to evaluate the impact of MSAB on the migration ability of HCC1937 cells overexpressing *KRT14* $\times 100$; D: Transwell migration and invasion assays were performed to assess the effect of MSAB on the migration and invasion abilities of HCC1937 cells overexpressing *KRT14* $\times 100$; a: oe-Ctrl + DMSO group; b: oe-Ctrl + MSAB group; c: oe-KRT14 + DMSO group; d: oe-KRT14 + MSAB group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group; ### $P < 0.001$ vs oe-KRT14 + DMSO group.

细胞骨架的中间丝的重要成分之一。近年来, KRT14 在癌症中的作用逐渐受到关注。Papafotiou et al^[9]指出, KRT14 在基底型膀胱癌中的表达显著增加, 与其侵袭性和不良预后相关。Srivastava et al^[10]发现 KRT14 促进口腔鳞状细胞癌细胞系中的细胞增殖、迁移和侵袭。尽管 KRT14 在某些来源于上皮的肿瘤中的功能已经较为明确, 但在不同乳腺癌亚型中的表达模式及其生物学功能仍不完全清楚。本研究通过 TCGA 数据库分析发现, KRT14 在 BLBC 组织中的 mRNA 表达水平显著高于正常乳腺组织及其他乳腺癌亚型。通过 qPCR、WB 和免疫组化实验验证了 KRT14 在临床 BLBC 样本中的高表达, 并发现其表达水平与 T 分期和组织学分级相关。这些结果表明, KRT14 不仅在 BLBC 中表达上调, 并且其表达水平与疾病的侵袭性和预后密切相关。这与 Verma et al^[11]研究发现的 EZH2-H3K27me3 介导的 KRT14 上调可以促进三阴性乳腺癌腹膜转移的部分结果一致, 提示 KRT14 在 BLBC 中高表达预示着不良的预后。与 Tsai et al^[12]关于 KRT14 增强口腔鳞状细胞癌的癌症干性和侵袭性的研究也有相似之处, 表明 KRT14 可能可以作为多种癌症的潜在预后标志物。为了探讨 KRT14 在 BLBC 中的作用, 本研究使用研究 BLBC 功能时较为常用的 ER、PR、HER-2 均为阴性的 HCC1937 和 MDA-MB-231 细胞为研究对象^[13]。通过细胞功能实验, 发现 KRT14 过表达显著增强了乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力, 而敲低 KRT14 则显著减弱了这些能力。这些结果与 Palmboos et al^[14]研究发现的 KRT14 在膀胱癌迁移和侵袭的调节作用一致, 表明 KRT14 在多种癌症中均具有促进细胞迁移和侵袭的作用。间充质表型的获得是 EMT 的重要特征, 而 EMT 在癌症的侵袭和转移中起关键作用^[15]。本研究细胞骨架的免疫荧光染色结果显示, KRT14 过表达后, 细胞呈间充质表型且呈离散型生长, 进一步支持了 KRT14 在促进细胞迁移和侵袭中的作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路在生物体的多个关键生命过程中发挥着重要作用, 当该通路出现异常激活时, 与多种疾病, 特别是癌症的发生和发展密切相关^[16]。本研究通过 WB 实验发现, KRT14 可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。同时, 免疫荧光实验结果显示, KRT14 过表达后, β -catenin 蛋白在细胞核内的定位增多, 这进一步证实了 KRT14 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活作用。为了验证 KRT14 是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控乳腺癌细胞的

迁移和侵袭能力, 本研究使用了 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 MSAB。实验结果显示, MSAB 可以消除过表达 KRT14 对 HCC1937 细胞的迁移和侵袭能力的增强作用, 这表明 KRT14 调控乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的机制可能是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路实现的。

参考文献

- [1] Xu Y, Gong M, Wang Y, et al. Global trends and forecasts of breast cancer incidence and deaths[J]. Sci Data, 2023, 10(1): 334. doi: 10.1038/s41597-023-02253-5.
- [2] Choi S R, Hwang C Y, Lee J, et al. Network analysis identifies regulators of basal-like breast cancer reprogramming and endocrine therapy vulnerability[J]. Cancer Res, 2022, 82(2): 320-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0621.
- [3] 刘行, 樊双琴, 晏小敏, 等. POLG 抑制剂阻碍线粒体生物合成抑制三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(10): 1720-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.005.
- [3] Liu X, Fan S Q, Yan X M, et al. POLG inhibitor suppresses migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via blocking mitochondrial biogenesis[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(10): 1720-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.005.
- [4] Dmello C, Srivastava S S, Tiwari R, et al. Multifaceted role of keratins in epithelial cell differentiation and transformation[J]. J Biosci, 2019, 44(2): 33.
- [5] Sharma N, Angori S, Sandberg A, et al. Defining the soluble and extracellular vesicle protein compartments of plasma using in-depth mass spectrometry-based proteomics[J]. J Proteome Res, 2024, 23(9): 4114-27. doi: 10.1021/acs.jproteome.4c00490.
- [6] Shen Y T, Huang X, Zhang G, et al. Pan-cancer prognostic role and targeting potential of the estrogen-progesterone axis[J]. Front Oncol, 2021, 11: 636365. doi: 10.3389/fonc.2021.636365.
- [7] Emens L A, Cruz C, Eder J P, et al. Long-term clinical outcomes and biomarker analyses of atezolizumab therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer: a phase 1 study[J]. JAMA Oncol, 2019, 5(1): 74-82. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4224.
- [8] Schmid P, Rugo H S, Adams S, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(1): 44-59. doi: 10.1016/S1473-2045(19)30689-8.
- [9] Papafotiou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, et al. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11914. doi: 10.1038/ncomms11914.
- [10] Srivastava S S, Alam H, Patil S J, et al. Keratin 5/14-mediated cell differentiation and transformation are regulated by TAp63 and

- Notch-1 in oral squamous cell carcinoma-derived cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2393–401. doi: 10.3892/or.2018.6298.
- [11] Verma A, Singh A, Singh M P, et al. EZH2-H3K27me3 mediated KRT14 upregulation promotes TNBC peritoneal metastasis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7344. doi: 10.1038/s41467-022-35059-x.
- [12] Tsai F J, Lai M T, Cheng J, et al. Novel K6-K14 keratin fusion enhances cancer stemness and aggressiveness in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, 38(26): 5113–26. doi: 10.1038/s41388-019-0781-y.
- [13] Zhang B, Liu R, Huang H, et al. Identifying CEACAM1 as a potential prognostic biomarker for basal-like breast cancer by bioinformatics analysis and in vitro experiments[J]. *J Cancer*, 2024, 15(19): 6468–78. doi: 10.7150/jca.101636.
- [14] Palmos P, Wang Y, Jerome N, et al. TRIM29 promotes bladder cancer invasion by regulating the intermediate filament network and focal adhesion[J]. *Res Sq*, 2023; rs.3.rs-3697712. doi: 10.21203/rs.3.rs-3697712/v1.
- [15] Tan Z, Sun W, Li Y, et al. Current progress of EMT: a new direction of targeted therapy for colorectal cancer with invasion and metastasis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1723. doi: 10.3390/biom12121723.
- [16] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97–110. doi: 10.1038/nrc3447.

KRT14 promotes the invasion and migration of basal-like breast cancer through activating the Wnt/ β -catenin pathway

Cheng Zheng¹, Zhang Manman¹, Zhou Jingni², Guo Qianying^{1,2}, Wu Zhengsheng^{1,2}

(¹Dept of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of Keratin 14 (KRT14) in Basal-like Breast Cancer (BLBC) and its biological functions and mechanisms. **Methods** The expression levels of KRT14 mRNA in BLBC and paracancer breast tissues were analyzed using The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. qPCR, Western blot (WB), and immunohistochemistry were employed to detect KRT14 expression in BLBC and adjacent normal tissues, and its correlation with clinicopathological features was analyzed. KRT14 overexpression and knockdown were performed in breast cancer cells, and cell scratch and transwell assays were performed to evaluate changes in migration and invasion abilities. To investigate the expression of proteins related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway, including β -catenin (catenin Beta 1), Wnt1 (wingless-type MMTV integration site family, member 1), MMP7 (matrix metalloproteinase 7), and c-Myc (cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog), as well as the cellular localization of β -catenin, WB and immunofluorescence (IF) techniques were employed. Additionally, a Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor was used to verify the mechanism of action of KRT14. **Results** The expression of KRT14 was significantly higher in BLBC tissues compared to normal tissues ($P < 0.05$), and was associated with higher T stage, and histological grade ($P < 0.05$). The overexpression of KRT14 significantly enhanced the migration and invasion abilities of breast cancer cells, while the knockdown of KRT14 significantly reduced those abilities ($P < 0.01$). The overexpression of KRT14 can increase the expression levels of Wnt/ β -catenin pathway-related proteins β -catenin, Wnt1, MMP7, and c-Myc, thereby activating the Wnt/ β -catenin pathway. Moreover, the inhibition of this pathway can eliminate the effects of KRT14 on cell migration and invasion. **Conclusion** The high expression of KRT14 in BLBC may promote the migration and invasion of breast cancer cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words KRT14; breast cancer; Wnt/ β -catenin signaling pathway; basal-like breast cancer; migration; invasion

Found program National Natural Science Foundation of China (No. 82473059)

Corresponding author Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn