

· 实验研究 ·

乳腺癌细胞耐药过程中 p38MAPK 活性与细胞凋亡的关系

曾少波 兰明银 管志远 李恒 严斌 张敏 周猛 江斌

【摘要】 目的 研究乳腺癌细胞耐药过程中 p38MAPK 活性与细胞凋亡的关系,探讨 p38MAPK 信号转导途径在其中的作用。**方法** 以 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM,采用流式细胞技术分析对细胞凋亡的影响;MTT 检测 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素的半数药物抑制浓度 (IC_{50});Western blot 检测 SB203580 处理 MCF-7/ADM 和 MCF-7 两株细胞后 p38MAPK 蛋白表达水平;RT-PCR 检测细胞内 MDR-1 mRNA 水平。**结果** SB203580 ($10 \mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 后 MCF-7/ADM 细胞的凋亡率为 $(26.73 \pm 4.90)\%$,与未干预组和对照组凋亡率相比差异有显著统计学意义 ($F = 143.80, P < 0.001$);MCF-7/ADM 细胞对阿霉素的敏感性明显提高 ($F = 148\ 927.10, P < 0.001$),相对逆转率达 68.45%;与对照组和未干预组相比,干预组的 MDR1 mRNA ($F = 9139.24, P < 0.001$) 及 p38MAPK ($F = 685.42, P < 0.001$) 蛋白表达水平明显降低。**结论** p38 MAPK 信号转导途径与乳腺癌耐药密切相关,其可能机制为 p38MAPK 保护人乳腺癌耐药细胞(MCF-7/ADM)逃避凋亡,阻断该通路可增强乳腺癌耐药细胞发生凋亡。

【关键词】 乳腺癌; 细胞凋亡; p38MAPK; 多药耐药

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Relationship between p38MAPK activity and apoptosis during drug resistance of breast carcinoma cell lines

ZENG Shao-bo, LAN Ming-yin, JIAN Zhi-yuan, LI Heng, YAN Bin, ZHANG Min, ZHOU Meng, JIANG Bin. General Surgery of Taihe Hospital, Yunchang Medical College, Shiyuan 442000, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between p38MAPK activity and cell apoptosis and the effect of p38MAPK signal transduction pathway during drug resistance of breast carcinoma cell lines. **Methods** Flow cytometry (FCM) was used to analyze the effect of p38MAPK inhibitor SB203580 on the apoptosis of MCF-7/ADM cell, a drug resistant human breast cancer cell. The inhibition concentration 50% (IC_{50}) of adriamycin on MCF-7/ADM was determined by MTT method *in vitro*. The MDR-1 mRNA level and p38MAPK protein expression in each group were detected by RT-PCR and Western Blot, respectively. **Results** After SB203580 action for 24 hours, the apoptosis rate of MCF-7/ADM was $(26.73 \pm 4.90)\%$, which was significantly lower than that of the control group and the untreated group ($F = 143.80$, $P < 0.001$). The relative reverse rate of the sensitivity of MCF-7/ADM to adriamycin in the SB203580 treated group was 68.45%. The p38MAPK protein ($F = 685.42$, $P < 0.001$) and MDR-1 mRNA expression ($F = 913.9$, $P < 0.001$) after 24-hour SB203580 action were markedly lower than the control group and the untreated group. **Conclusion** p38MAPK signal pathway plays an important role in drug resistance of breast carcinoma cell. p38MAPK can protect MCF-7/ADM cells from apoptosis, and blocking the p38MAPK signal pathway can increase the apoptosis in drug resistant breast carcinoma cell lines.

【Key words】 Breast carcinoma; Cell apoptosis; p38MAPK; Multidrug resistance

分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族通过三级酶促级联反应激活并调节特定的基因表达,是介导细胞反应的重要信号系统^[1-2],在细胞增殖和凋亡的调节中起重要作用。肿瘤细胞在化疗药物作用下,出现多药耐药基因 1 (MDR1) 表达增加的同时,MAPK 活性也增加。p38 MAPK 信号途径是蛋白激酶家族中的重要组成部分,经外界刺激而激活,故又称为 MAPK 应急信号通路;其在消化系统肿瘤细胞凋亡、生长、转移、耐药等方面具有十分重要的作用^[3]。抑制 p38MARK 的功能可提高肿瘤对化疗药物诱导细胞凋亡的敏感性从而产生抗肿瘤作用。本试验通过研究乳腺癌细胞耐药过程中 p38MAPK 活性与凋亡的关系,以及抑制这一通路后对耐药细胞凋亡的影响和耐药逆转,探讨其在乳腺肿瘤化疗中的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌耐药细胞株(MCF-7/ADM)及敏感株 MCF-7 购自武汉大学菌种保藏中心;四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品;p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 为 Promega 公司产品;兔抗人 p38MAPK 单克隆抗体(武汉凌飞公司);增强化学发光(ECL)试剂盒(Sigma 公司,美国);引物和 DNA 片段由上海博亚有限公司合成。

1.2 细胞培养和分组

MCF-7/ADM 及 MCF-7 细胞于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中常规培养。MCF-7/ADM 细胞阿霉素维持浓度为 0.5 mmol/L,实验时耐药株脱离药物至少 2 周。将 MCF-7/ADM 细胞分为 3 组:SB203580 干预组(10 μ mol/L),不进行任何处理组(未干预组)和二甲基亚砜(DMSO)干预对照组。然而在检测 IC₅₀时,因各组均加入 DMSO 进行试验,为避免干扰,本研究将 DMSO 干预对照更换为原始敏感株 MCF-7 进行对照,而且在检测 MDR 基因时,同时检测了 MCF-7 的 MDR 基因以进行对比。

1.3 观察 SB203580 干预后细胞凋亡

干预 24 h 后消化细胞,1000 r/min 离心 5 min,反复 3 次,弃上清液,收集细胞,100 μ l PBS 重悬细胞,加入含 RNA 酶的碘化丙啶(PI)染色剂 300 μ l,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪(FACS Calibur, Becton- Dickinson 公司)检测,以 Cell Quest 软件分析。

1.4 MTT 检测阿霉素的半数抑制浓度(IC₅₀)

分别收集干预 24 h 后 MCF-7/ADM 细胞,对照的 MCF-7 细胞及未干预 MCF-7/ADM 细胞,以 1×10^4 /mL 的细胞数接种至 96 孔板上,每孔 100 μ l,每孔加入 100 ~ 500 ng/ml 的阿霉素,每组设三个复孔。培养 48 h 后每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃上清液,加入 200 μ l DMSO,振荡 10 min,在自动酶标平板阅读仪以 570 nm 波长参考 630 nm 波长读取吸光度(A)值。相对逆转效率 = (IC₅₀A - IC₅₀B)/IC₅₀A。A 为未干预组,B 为干预组。

1.5 Western blot 检测各组细胞中 p38MAPK 蛋白的表达

收集 SB203580 干预 24 h 组、0.1% DMSO 对照组、未干预组的 MCF-7/ADM 细胞。参照《分子克隆》提取细胞的胞浆蛋白,以 β -actin 的水平作为等量蛋白质上样对照(空白对照组),每个样本至少重复 3 遍。取 50 μ g 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,转至硝酸纤维素膜上;室温封闭 2 h 后,用含 0.05 %

Tween-20 的 TBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min;加入相应的 p38MAPK 单克隆抗体(1:800),4 °C 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000),37 °C 摇床温育 2 h,ECL 显色系统显色。最后经 ECL 系统曝光显影,通过凝胶分析系统分析蛋白的表达。

1.6 RT-PCR 检测各组细胞 MDR1 基因的表达

Trizol 试剂提取细胞总 RNA,行逆转录成 cDNA,取 1 μ l 进行 PCR 反应。以 β -actin 作为内参照(基因库编号 BC016045), β -actin 序列:上游引物 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游引物 5'-CTCCTTAATGTCACG-CACGATTTC-3';MDR1 序列:上游引物:5'-CCCATCATTTGCAATAGCAGG-3';下游引物:5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3';反应条件:94 °C 4 min,94 °C 35 s,54 °C 40 s,72 °C 30 s,30 个循环,72 °C 7 min。取 3 μ l PCR 产物进行 1.0 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外照相并进行扫描分析,每个样本重复 3 遍。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 t 检验和单因素方差分析进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,用 SPSS11.5 统计软件完成。

2 结果

2.1 抑制 p38MAPK 信号传导通路对乳腺癌耐药细胞凋亡的影响

SB203580 (10 μ mol/L) 干预乳腺癌耐药株 MCF-7/ADM 的凋亡率为 $(26.73 \pm 4.90)\%$;未干预组凋亡率为 $(0.78 \pm 3.85)\%$,0.1% DMSO 对照组凋亡率为 $(0.54 \pm 1.56)\%$,与干预组相比较差异有统计学意义($F = 143.80$, $P < 0.001$,图 1)。

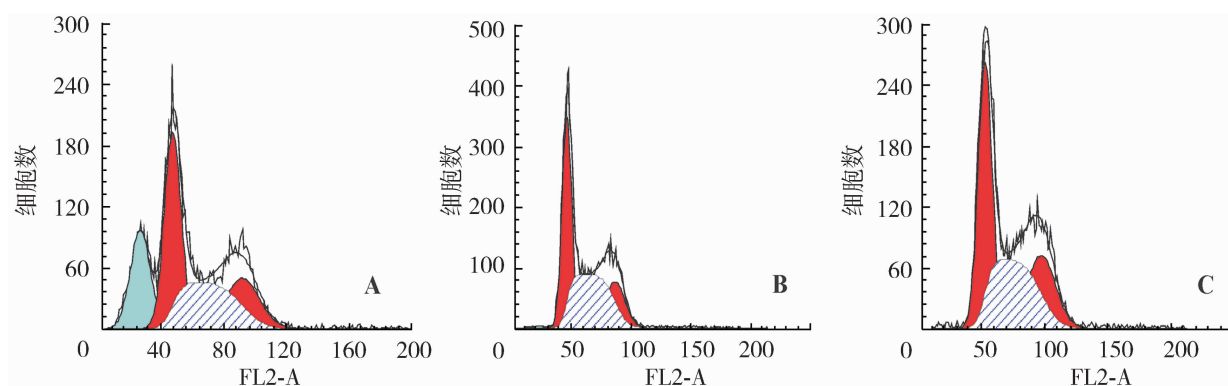


图 1 A 干预组、B 未干预组和 C 二甲基亚砷(DMSO)对照组的细胞凋亡情况

2.2 MCF-7/ADM 细胞药物敏感性的变化

干预组 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素的半数致死浓度与未干预组相比明显下降($F = 148\,927.10, P < 0.001$), SB203580 作用于 MCF-7/ADM 细胞后相对逆转效率达 68.45% (表 1), 表明 SB203580 可恢复 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素的敏感性。

表 1 SB203580 对阿霉素 IC_{50} 的影响

| 组别 | 样本数 | $IC_{50}/(ng \cdot mL^{-1})$ |
|---------------------------------|-----|------------------------------|
| MCF-7 | 5 | 0.31 ± 0.04 |
| MCF-7/ADM | 5 | 56.80 ± 0.22 |
| MCF-7/ADM-SB203580 ^a | 5 | 17.92 ± 0.18 |

a: $P < 0.01$, 与 MCF-7/ADM 细胞组比较; 干预组 (MCF-7/ADM-SB203580) 的相对逆转效率为 68.45%

2.3 Western blot 检测 MCF-7/ADM 细胞 p38MAPK 的蛋白表达

MCF-7/ADM 细胞较高表达 p38MAPK; 以空白对照组灰度值为 1, 扫描 DMSO 组、未干预组及 SB203580 干预组 24 h 电泳条带的灰度比值分别为 0.92 ± 0.017 , 0.89 ± 0.026 和 0.33 ± 0.021 ; 与对照组和未干预组相比, 特异性 p38MAPK 抑制剂 SB203580 能明显降低 p38MAPK 蛋白表达水平($F = 685.419, P < 0.001$, 图 2)。

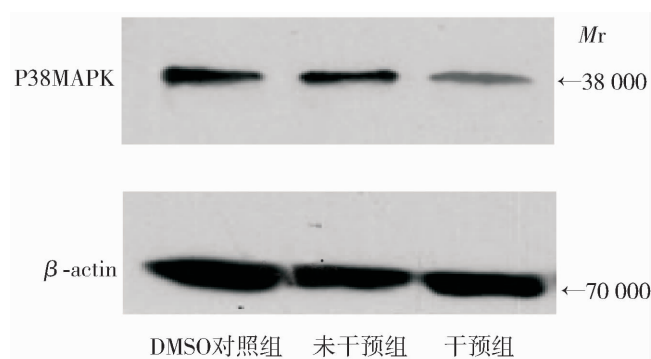
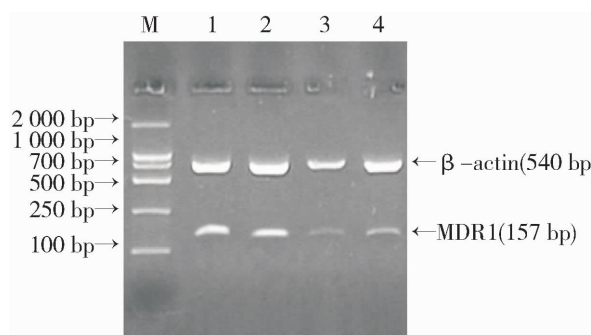


图 2 MCF-7/ADM 细胞的 Western blot 分析

2.4 SB203580 干预 MDR1 基因效果的检测(RT-PCR)

MDR1 和内参 β -actin 分别位于 157 bp 和 834 bp 处。以 β -actin 的灰度为 1, SB203580 处理后 24 h, 干预组、未干预组和 DMSO 对照组的 MDR1 表达分

别为 $(18.14 \pm 0.49) \%$ 、 $(67.27 \pm 0.61) \%$ 、 $(67.27 \pm 0.32) \%$ ($F = 9139.24$, $P < 0.001$), 干预组 MCF-7/ADM 的 MDR1 mRNA 表达显著下调, 甚至低于 MCF-7 细胞的 MDR1 mRNA 表达水平 $(25.90 \pm 3.25) \%$, 且差异有统计学意义($t = 4.098$, $P = 0.015$, 图 3)。



M:DL-2000;1:DMSO 对照组(MCF-7/ADM);2:未干预组(MCF-7/ADM);
3:干预组(MCF-7/ADM);4:敏感细胞组(MCF-7)

图3 MCF-7/ADM 细胞干预 24 h 后 MDR1mRNA 的表达

3 讨论

凋亡是单个细胞的主动死亡过程。在正常情况下,机体可通过诱导凋亡来清除受损或无生理意义的细胞,有利于机体环境的稳定。而在肿瘤中,肿瘤细胞抵御凋亡的能力明显增强,从而实现自我保护,以利于生存。目前认为,肿瘤细胞产生了抵抗细胞凋亡的能力就产生了耐药性,凋亡抑制与细胞耐药密切相关^[4-5]。

MAPK 级联途径是细胞内的主要信息传递系统。在化疗药物作用下,肿瘤细胞的 MDR1 表达增加,同时 p38MAPK 活性也增加。研究发现肿瘤细胞中 p38MAPK 水平与化疗效果密切相关。有文献报道,p38MAPK 信号转导途径与肝癌耐药密切相关,可能参与肝癌耐药的形成^[6]。p38MAPK 信号通路抑制剂能逆转肿瘤耐药。Lim 等^[7]发现 p38MAPK 的活性与 MDR 显型有关,p38MAPK 抑制剂 SB203580 可增加 SNU-C4 结肠癌细胞对外源性胰岛素的敏感性,使细胞的凋亡增加,SNU-C4 结肠癌的生长明显受到抑制。

有研究表明:阿霉素在诱导乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞凋亡的同时活化乳腺癌细胞的 p38- MAPK 信号传导通路^[8]。本实验证实:p38MAPK 抑制剂 SB203580 可促进乳腺癌耐药细胞凋亡,同时使 p38MAPK 蛋白表达水平降低,并使 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素的敏感性增加;Western bolt 结果分析可见与

对照组和未干预组相比,SB203580 能明显降低 MCF-7/ADM 细胞 p38MAPK 蛋白表达水平;RT-PCR 结果显示 SB203580 能有效抑制 MDR1 基因转录,使 MDR1 的 mRNA 水平低于敏感细胞株 MCF-7 的表达水平。由此推断 p38MAPK 信号转导途径与乳腺癌耐药密切相关,其可能机制为 p38MAPK 能保护人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 逃避凋亡,而阻断该通路可增强乳腺癌耐药细胞发生凋亡。

MAPK 信号传导通路在肿瘤的形成、进展和转移中都扮演着重要角色,该通路的成员已经成为肿瘤新药研制的分子靶点^[9]。p38MAPK 是一个多功能的细胞因子,它对肿瘤的作用与肿瘤的类别以及不同下游通路均可能有关。抑制这一通路可能会增强乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。本试验为 p38MAPK 抑制细胞凋亡的作用提供了新的实验证据,使其有可能成为肿瘤耐药治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Ding Y, Boguslawski E A, Berghuis B D, *et al.* Mitogen-activated protein kinase signaling promotes growth and vascularization of fibrosarcoma. *Mol Cancer Ther*,2008,7:648 – 658.
- [2] Genovese T, Esposito E, Mazzon E, *et al.* Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the development of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther*,2008,325:100 – 114.
- [3] Hsieh Y H, Wu T T, Huang C Y, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*,2007,67:4320 – 4327.
- [4] Jablonski E M, Mattocks M A, Sokolov E, *et al.* Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*,2007,250:36 – 46.
- [5] Wang W S, Chen P M, Wang H S, *et al.* Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis*,2006,27:1113 – 1120.
- [6] Lee J Y, Han C Y, Yang J W, *et al.* Induction of glutathione transferase in insulin-like growth factor type I receptor-overexpressed hepatoma cells. *Mol Pharmacol*,2007,72:1082 – 1093.
- [7] Lim S J, Lee Y J, Lee E. p38MAPK inhibitor SB203580 sensitizes human SNU-C4 colon cancer cells to exisulind-induced apoptosis. *Oncol Rep*,2006,16:1131 – 1135.
- [8] 魏军民,侯明,李丽珍,等. 小分子干扰 RNA 联合反义脱氧寡核苷酸靶向逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 多药耐药的研究. *中华乳腺病杂志:电子版*,2008,2:436 – 442.
- [9] Huang D, Ding Y, Luo W M, *et al.* Teh BT inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res*,2008,68:81 – 88.

(收稿日期:2008-08-20)

(本文编辑:陈莉)

曾少波,兰明银,管志远,等. 乳腺癌细胞耐药过程中 p38MAPK 活性与细胞凋亡的关系[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*,2009,3(1):46 – 52.