

文章编号:1005-6947(2007)12-1197-03

· 简要论著 ·

雌激素和三苯氧胺对 MCF-7 乳腺癌细胞 Akt 表达的影响及其意义

王秀玲¹, 益莉娜¹, 丁佩芬¹, 邹珏¹, 洪月琳², 郑唯强³

(上海市第七人民医院 1. 病理科 2. 外科, 上海 200137; 3. 第二军医大学长海医院 病理科, 上海 200433)

摘要:为探讨雌激素和三苯氧胺对乳腺癌细胞 Akt 表达的影响。作者采用 Western blot 和免疫组化法检测上述两种药物作用下 Akt 的表达。结果示,三苯氧胺作用后 Akt 的表达明显高于对照组和雌激素组,以后者的表达为最低。提示: Akt 的激活状态可能是乳腺癌内分泌治疗中产生耐受的重要机制之一,其有可能作为治疗的新靶点。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(12): 1197-1199]

关键词: 乳腺肿瘤/药物治疗; Akt; 信号转导; 内分泌治疗

中图分类号: R 737.9

文献标识码: B

Akt 信号传导途径在肿瘤形成过程中起着关键的信号调节作用,它与肿瘤细胞的增殖、凋亡的抑制、端粒酶活性的增强、间质新生血管的形成以及肿瘤细胞的侵袭和转移能力密切相关^[1]。然而,它与乳腺癌雌激素受体(ER)激活或抑制后的信号传导通路之间的关系研究较少。作者拟通过检测 ER 阳性的 MCF-7 细胞在 ER 激活和抑制状态下 Akt 的表达,初步探索两者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 试剂和细胞培养

ER 阳性、表达野生型 p53 的 MCF-7 乳腺癌细胞株由第二军医大学肿瘤研究所提供。培养试剂 DMEM, HEPES, 胎牛血清和胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品。雌激素(E2)为上海信谊药业公司生产,分子质量为 268.36,将其溶于 75% 乙醇中,用三蒸馏水稀释成浓度为 4~10 mol/L 的储存液。三苯氧胺(TAM)为上海复旦复华药业公司生产,分子质量为 563.65,溶于无水乙醇中,

稀释成浓度为 3~10 mol/L 的储存液。将两种储存液置于冰箱备用。细胞培养按常规方法进行。每日观察细胞生长情况,贴壁 3~5 d 天传代 1 次。传代用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将实验细胞分成:(1)空白对照组(仅加培养液);(2)溶剂对照组(加 10% 乙醇);(3)加 E2 组;(4) TAM 组。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)比色法测细胞存活率(CS) 取对数生长期细胞,胰酶消化,吹打成单细胞悬液,计数后接种于 96 孔板,每孔 200 μ L 约 10^4 个细胞,各组加入相应溶液后于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱内过夜,待细胞贴壁。培养 72 h 后,每孔加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L 并培养 4 h 至孔内出现蓝色结晶。加 0.04 N 盐酸异丙醇 100 μ L/孔,使沉淀溶解后在酶联免疫检测仪上以 490 nm 波长测定各孔光吸收值,然后换算成细胞存活率。

1.2.3 MTT 比色分析法筛选 E2 及 TAM 最佳作用浓度 培养液中加 10% 乙醇对细胞的生长无明显影响(CS 为 24%)。E2 在 10^{-8} mol/L 时,刺激 MCF-7 细胞生长的作用最显著(CS 为 51%); TAM 在 10^{-6} mol/L 的浓度时,抑制 MCF-7 细胞生长的作用最显著(CS 为 14%)。将培养液稀释 E2 和 TAM 至 10^{-8} mol/L 和 10^{-6} mol/L,并分别作用于 MCF-7 细胞,制备细胞爬片。

基金项目:上海浦东新区社会发展局卫生科技资助项目(PW2006A-24)。

收稿日期:2007-05-16; **修订日期:**2007-11-23。

作者简介:王秀玲,女,上海人,上海市第七人民医院副主任医师,主要从事乳腺肿瘤病理方面的研究。

通讯作者:郑唯强 E-mail:zhengwq@hotmail.com

1.2.4 免疫印迹(Western blot)分析 Akt 的表达

将各组细胞置入裂解缓冲液中4℃静置24 h,低温高速离心,提取上清液即为总蛋白。经电泳、转印,5%正常小牛血清封闭,抗 Akt 抗体(Santa Cruz)4℃下孵育2 h后再加二抗,DAB显色,结果经自动电泳凝胶成像分析仪采集,进行条带的吸光度值(OD)测定。

1.2.5 免疫组织化学分析 Akt 的表达

取3个直径为6 cm的培养皿,各放2张盖玻片,待各组细胞消化后接种于其中过夜。细胞贴壁后取出玻片,磷酸缓冲液(PBS)洗涤,4%多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水干燥;用中性树胶黏附于载玻片上,43℃烘烤过夜,-20℃保存。不同处理组在同一条件下以EnVision法进行染色。其Akt抗体按1:200稀释后作为工作浓度。染色后细胞浆或细胞膜呈现棕黄色着色判定为阳性。所有玻片在同一标准条件下,应用Motic Med 6.0数码医学图象分析系统(协和医科大学、北京航空航天大学研制)测定其积分光密度(integral optic density, IOD)值,所得的平均值为最终值。

1.3 统计学处理

数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,统计检验采用 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot 检测各组 MCF-7 细胞 Akt 的表达

Akt 在 TAM 实验组的表达明显高于对照组和 E2 实验组,而以 E2 组的表达最低(附表)。

附表 两种方法检测各组 MCF-7 细胞 Akt 的表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Western blot 分析	免疫组化分析
空白对照	1.3954 ± 0.097	108.23 ± 9.72
溶剂对照	1.0689 ± 0.018	99.05 ± 8.94
E2	0.7924 ± 0.194	81.23 ± 9.72 ¹⁾
TAM	1.9375 ± 0.116	137.73 ± 12.43 ^{1),2)}

注:1)与对照组比较 $P < 0.05$; 2)与 E2 组比较, $P < 0.01$

2.2 免疫组织化学分析

MCF-7 细胞示棕黄色颗粒的 Akt 阳性表达主要在细胞膜和部分胞质中。光镜下计数200个细胞,计算阳性细胞百分数,重复3次后取均值。在各实验组中均可见有 Akt 的阳性着色,TAM 组的表达强度高对照组和 E2 组,对照组高于 E2 组(图1-3)。免疫组织化学结果显示,TAM 组的表达明显高于2个对照组而且 E2 组的表达最低,差异有统计学意义(附表)。

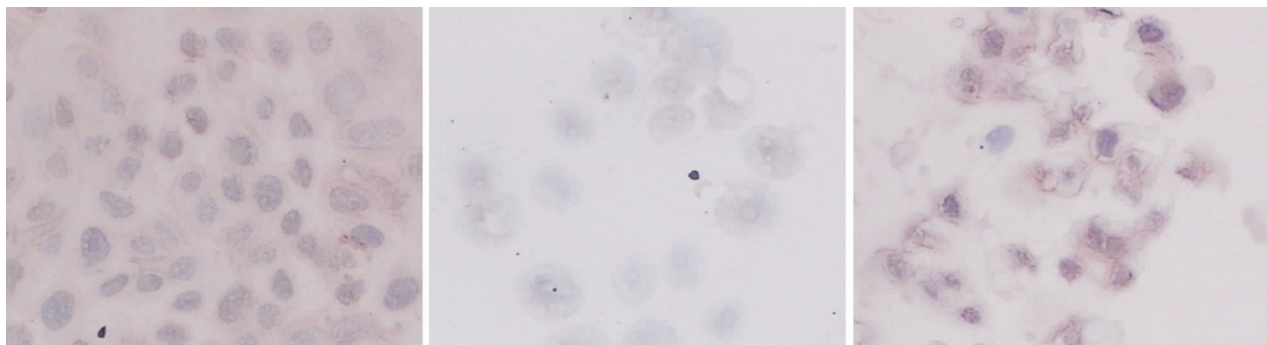


图1 乳腺癌 MCF-7 细胞 Akt 的表达, 图2 乳腺癌 MCF-7 细胞经 E2 处理后 图3 乳腺癌 MCF-7 细胞经 TAM 处理后 Akt 的表达 (EnVision × 200)

3 讨论

Akt 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 cAMP 依赖的蛋白激酶 A, 蛋白激酶 G, 蛋白激酶 C (AGC) 超家族。它是 PI3K/Akt 通路中的关键分子,在促进肿瘤细胞的生长、增殖、抑制细胞凋亡、促使细胞侵袭和转移、促进血管生成、抵抗化疗和放疗中细胞的凋亡等方面起着重要作用^[2]。其作用机

制主要通过以下途径:(1)经 PI3K/Akt/mTOR 途径^[3]; (2)Akt 磷酸化 P21Cip1/WAF1^[4]; (3)Akt 磷酸化 GSK3 (糖原合成激酶-3)^[5]; (4)Akt 磷酸化 Foxo 家族的 FKHR, FKHL1, AFX^[6]; (5)Akt 磷酸化 PDE3B 等^[7]。可见其对细胞的作用并非直接受 ER 的调控。本研究发现,雌激素对 Akt 表达的作用最低。文献^[1]报道,雌激素对 Akt 的激活作用须依赖于 ErbB2 的信号途径,而 MCF-7 为 ErbB2 表达阴性的细胞;相反,

TAM 对 Akt 具有明显的激活作用。此现象值得推敲。TAM 是一种非甾体类抗雌激素药物,广泛应用于雌激素依赖性乳腺肿瘤的治疗^[8];可加速 ER 阳性细胞的死亡,减少乳腺癌的复发与病死率。一般认为,TAM 通过与雌激素竞争 ER,从而实现其抗雌激素作用^[9]。有报道^[10] TAM 的作用与抑制 MCF-7 细胞生长、细胞形态学特异性改变和细胞凋亡密切相关。转化生长因子(TGF- β 1)可能是 TAM 诱导细胞凋亡的中介介质^[11]。结合本研究,推测 TAM 可能是通过另一种信号途径而实现。Clark 等^[12]发现,化疗药物和 TAM 均能显著激活 PI3K 途径,从而提高活化的 Akt 水平,导致乳腺癌细胞对化疗药物和 TAM 的作用产生拮抗。这种现象也可能解释临床上有部分乳腺癌患者对内分泌治疗产生抵抗的原因^[13]。另外,乳腺癌的 Akt 过表达也能通过 IV 型胶原蛋白上调整合素 β 1,从而增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[14]。

因此,了解 Akt 的信号通路在乳腺癌发生发展中的作用及肿瘤对内分泌治疗产生耐受的机制,有可能为肿瘤的基因治疗、抗肿瘤药物的开发提供新的思路。

参考文献:

- [1] Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 3963 - 3966.
- [2] Stambolic V, Woodgett JR. Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(9): 461 - 466.
- [3] Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, *et al.* AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen[J]. *J Pathol*, 2005, 207(2): 139 - 146.
- [4] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655 - 1657.

- [5] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy[J]. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381 - 395.
- [6] Gao N, Flynn DC, Zhang Z, *et al.* G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/MTOR/P70S6K1 signalling in human ovarian cancer cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(2): C281 - 291.
- [7] Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnar FF, *et al.* Overexpression of AKT2/protein kinase beta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1): 196 - 206.
- [8] 张伟,张军初,徐圻昀,等. 维生素 E 琥珀酸酯对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(12): 918 - 921.
- [9] 申郑堂,罗沙阳,王守满,等. 乳腺癌哨兵淋巴结转移与肿瘤大小和癌基因及激素受体表达关系的临床观察[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(10): 728 - 731.
- [10] Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, *et al.* The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer[J]. *Euro J Cancer*, 2006, 42(5): 629 - 635.
- [11] Scott DJ, Parkes AT, Ponchel F, *et al.* Changes in expression of steroid receptors, their downstream target genes and their associated co-regulators during the sequential acquisition of tamoxifen resistance in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(3): 557 - 565.
- [12] Clark AS, West K, Streicher S, *et al.* Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(9): 707 - 717.
- [13] Ruggiero D, Sonenberg N. The Akt of translational control[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7426 - 7434.
- [14] 郑唯强,郑建明,卢建,等. 成束蛋白在乳癌的表达及其与雌激素受体的相互关系和意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(5): 408 - 411.

《医学信息》手术学分册 2008 年征订启事

《医学信息》手术学分册(ISSN 1006 - 1959 CN 61 - 1278/R)是由中华人民共和国科学技术部主管国家级科技期刊。是中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国期刊全文数据库全文收录期刊,中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)全文收录期刊。主要栏目有:专家论坛,临床论著,短篇论著,经验交流,综述与讲座,研究生园地,新技术与新方法介绍,经验与教训,药物与临床,护理园地等。

2008 年《医学信息》手术学分册的征订工作现已开始。本刊为月刊,国内外公开发行。每本定价 8 元(含邮资),全年定价 96 元。全国各地邮局均可办理征订,邮发代号:52 - 88,编辑部也可直接办理订阅。

编辑部地址:河南省卫辉市健康路 88 号新乡医学院第一附属医院 邮编:453100

电话:0373 - 4402935 传真:0373 - 4402794 E-mail: yxxxss1987@126.com