

[文章编号] 1000-4718(2009)05-0873-04

13 - MTD 通过激活 MAPK 途径和抑制 Akt 存活途径诱导乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡*

蔡清清^{1,2}, 林天歆^{3,4}, 范新兰⁴, 尹心宝³, 董文³, 黄立³, 林桐榆^{1,2,Δ}(¹ 中山大学肿瘤医院内科, ² 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060;中山大学附属第二医院 ³ 泌尿外科, ⁴ 医学研究中心, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 探讨侧链饱和脂肪酸 13 - 甲基十四烷酸 (13 - MTD) 诱导人乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡的作用机制。方法: 140 mg/L 13 - MTD 处理体外培养的人乳腺癌 MCF - 7 细胞和人乳腺正常细胞, 采用流式细胞仪检测技术观察 13 - MTD 对人乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡的影响, 免疫印迹法检测 13 - MTD 处理后细胞内 c - Jun 氨基末端激酶 (JNK), p38, Fas 相关死亡结构域蛋白 (FADD) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 等蛋白磷酸化变化。结果: 流式细胞仪实验结果显示 13 - MTD 能有效地诱导人乳腺癌 MCF - 7 细胞凋亡, 但不引起正常人乳腺上皮细胞凋亡。免疫印迹检测显示经 13 - MTD 处理后的人乳腺癌 MCF - 7 细胞 JNK 和 p38 磷酸化蛋白明显增加, Akt 磷酸化蛋白明显减少。结论: 13 - MTD 是一个新的安全高效抗肿瘤药物, 其作用机制可能是通过激活 MAPK 途径和抑制 Akt 存活途径来诱导肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 13 - 甲基十四烷酸

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A

13 - MTD induces apoptosis of MCF - 7 breast cancer cells by activating MAPK pathway and inhibiting Akt signaling

CAI Qing - qing^{1,2}, LIN Tian - xin^{3,4}, FANG Xin - lan⁴, YIN Xin - bao³, DONG Wen³, HUANG Li³, LIN Tong - yu^{1,2}(¹ Department of Medical Oncology, Cancer Center, Sun Yat - sen University; ² State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China; ³ Department of Urology; ⁴ LIN Bai - xin Medical Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat - sen University, Guangzhou 510120, China. E - mail: tongyulin@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of 13 - methyltetradecanoic acid (13 - MTD), a saturated branched - chain fatty acid, on apoptotic induction in breast carcinoma cell line MCF - 7 and its underlying mechanisms. **METHODS:** Breast carcinoma cell line MCF - 7 and normal breast epithelial cells MaEC were treated with solvent or 13 - MTD at concentration of 140 mg/L. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. Phosphorylation of JNK, p38, FADD and Akt after treated with 13 - MTD were detected by Western blotting. **RESULTS:** 13 - MTD effectively induced apoptosis of breast carcinoma cell line MCF - 7 and no influence to normal breast epithelial cells MaEC, which were confirmed by flow cytometry analysis, was observed. The results of Western blotting showed that obvious increase in p38 and JNK phosphorylation. No significant difference of FADD phosphorylation was observed. However, evidently decrease in Akt phosphorylation was found after treated with 13 - MTD. **CONCLUSION:** 13 - MTD was a new safe, effective chemotherapeutic drug. Its underlying mechanisms are through activating MAPK pathway and inhibiting Akt pathway to induce the cancer cells apoptosis.

[KEY WORDS] Breast neoplasms; Apoptosis; 13 - methyltetradecanoic acid

乳腺癌是危害女性健康的主要恶性肿瘤之一。全世界每年约有 120 万妇女发生乳腺癌, 发病率为 10% - 15%, 并以每年 0.2% - 8% 的幅度上升^[1]。乳腺癌发病率不断提高, 已逐渐引起肿瘤研究者的关注。外科手术为基础的综合治疗是治疗早期乳腺癌的首选方法, 但仍有 30% 患者复发^[2]。对于转移、

[收稿日期] 2009 - 01 - 13 [修回日期] 2009 - 03 - 07

* [基金项目] 广东省科技计划项目资助 (No. 2004B30301019); 广东省医学科学研究基金资助项目 (No. B2005034); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 8151008901000043)

Δ 通讯作者 Tel: 020 - 87343356; E - mail: tongyulin@hotmail.com

复发的晚期乳腺癌,药物治疗(化疗)仍然是有力的武器,然而目前的化疗药物有对人体产生难以忍受的毒副作用,如骨髓抑制、脱发等。因此,探寻疗效确切且高效、低毒的抗肿瘤药物成为当前乳腺癌治疗学研究的热点之一。

侧链饱和脂肪酸 13 - 甲基十四烷酸(13 - methyltetradecanoic acid, 13 - MTD)是大豆发酵产物的有效成分,已有研究表明 13 - MTD 能诱导肿瘤细胞的凋亡而杀灭肿瘤细胞^[3-6]。本实验研究 13 - MTD 对人乳腺癌细胞 MCF - 7 株的抗肿瘤作用,为寻找有效治疗乳腺癌的化疗药物提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 13 - MTD 的制备

制备 13 - MTD (Sigma) 1 mol/L 于 0.8% Tween80 中,对照组为含 0.8% Tween 80 的 PBS 溶液。

2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF - 7 (ATCC)用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养。人乳腺正常上皮细胞 MaEC (mammary epithelial cell)在乳腺上皮细胞培养液 MaECM (mammary epithelial cell medium) 中生长(细胞及培养液均购自 Cambrex)。

3 流式细胞仪凋亡检测 (Annexin V/PI 双染色法)

取乳腺癌 MCF - 7 细胞和 4 - 6 代的乳腺正常细胞,以 5×10^8 cells/L 密度接种于 6 孔板上,每孔 1 mL,待细胞贴壁后给予 35 mg/L 13 - MTD 处理。培养 24 h 后消化收集细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,加入 100 μ L 混合缓冲液和异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记 Annexin V - FITC (20 mg/L) 10 μ L,室温避光 30 min,再加入 PI (propidium iodide, 50 mg/L) 5 μ L,避光反应 5 min 后,加入 400 μ L 混合缓冲液,立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测,同时以不加 Annexin V - FITC 及 PI 作为阴性对照。

4 免疫印迹检测

收集细胞后,细胞团用 RIPA 液裂解细胞,用 BCA 法检测蛋白浓度,用 SDS - PAGE 法电泳分离蛋白后,用相应 I 抗进行免疫印迹试验, I 抗包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt), p38, c - Jun 氨基末端激酶 (c - jun N - terminal kinase, JNK), Fas 相关死亡结构域蛋白 (Fas associated protein with death domain, FADD) 以及其相应的磷酸化抗体 (Cell Signal)。

5 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,处理组之间比较均采用单因素方差分析。统计分析全部用 SPSS

for Windows 11.0 统计软件包完成。

结 果

1 流式细胞仪检测 (Annexin V/PI 双染色法)

图 1 结果显示人乳腺癌细胞经 13 - MTD 处理 24 h 后,大部分发生凋亡,与相应对照组比有显著差异。而人乳腺正常上皮细胞经 13 - MTD 处理前后产生凋亡的细胞数量相似,说明 13 - MTD 能特异性地诱导人乳腺癌细胞凋亡,并不作用于正常的乳腺上皮细胞。

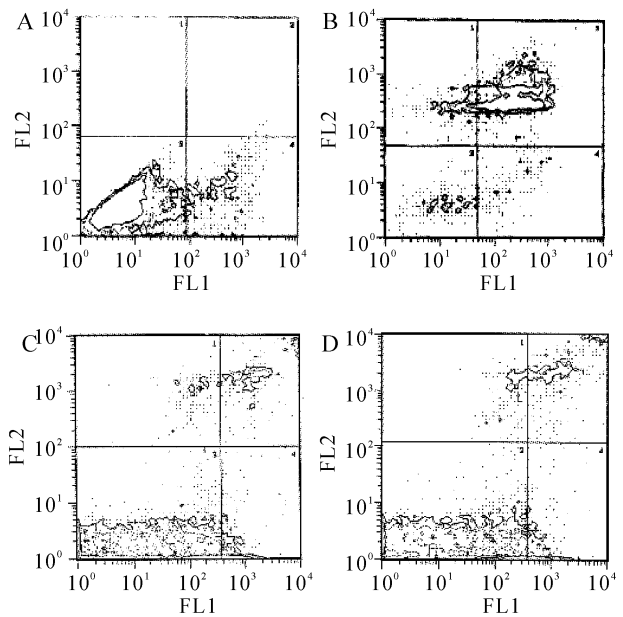


Fig 1 Annexin V - FITC flow cytometry results for cells treated with 13 - MTD. A: Breast cancer cell line MCF - 7, percentage of apoptotic cells were 1.5% \pm 0.2%; B: MCF - 7 treated with 13 - MTD, percentage of apoptotic cells were 89.5% \pm 5.6%. There were significant differences between A and B ($n = 3, P < 0.01$); C: Normal human mammary epithelial cells, percentage of apoptotic cells were 4.7% \pm 0.7%; D: Normal human mammary epithelial cells treated with 13 - MTD, percentage of apoptotic cells were 4.8% \pm 0.5%. No significant differences were shown between C and D ($n = 3, P > 0.05$).

图 1 13 - MTD 处理细胞后 Annexin V - FITC 流式细胞仪检测结果

2 癌细胞凋亡作用机制分析

结果显示(图 2、3),与相应对照组相比,经 13 - MTD 处理过的癌细胞, JNK 和 P38 蛋白磷酸化明显增加; FADD 蛋白磷酸化程度没有发生显著变化; Akt 蛋白磷酸化明显减少。说明 13 - MTD 是通过激活 MAPK 凋亡途径和抑制 Akt 存活途径来诱导人乳腺癌 MCF - 7 细胞的凋亡。

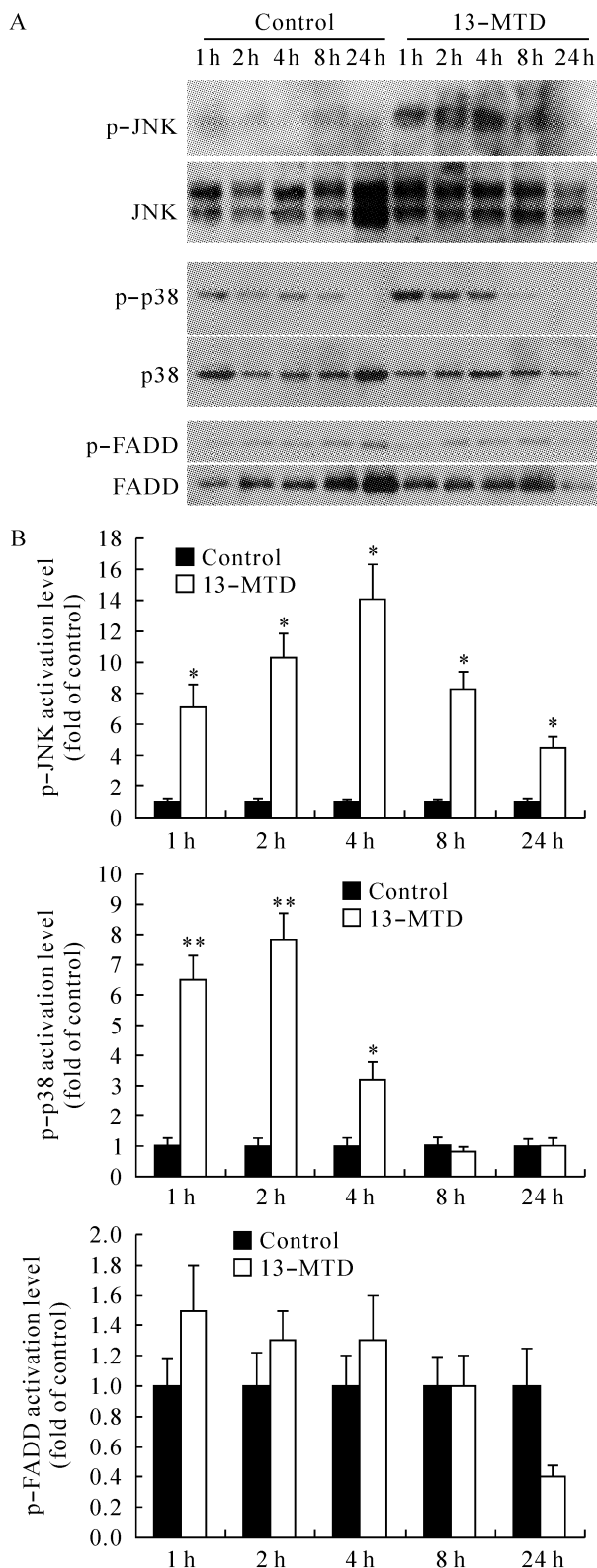


Fig 2 JNK and p38 kinase activation by 13 - MTD. JNK and p38 kinase were activated within 1 h of 13 - MTD treatment as indicated by increased phosphorylation (phospho - JNK and phospho - p38). There were no increased phosphorylation for FADD. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 13 - MTD 激活 JNK 和 P38 激酶

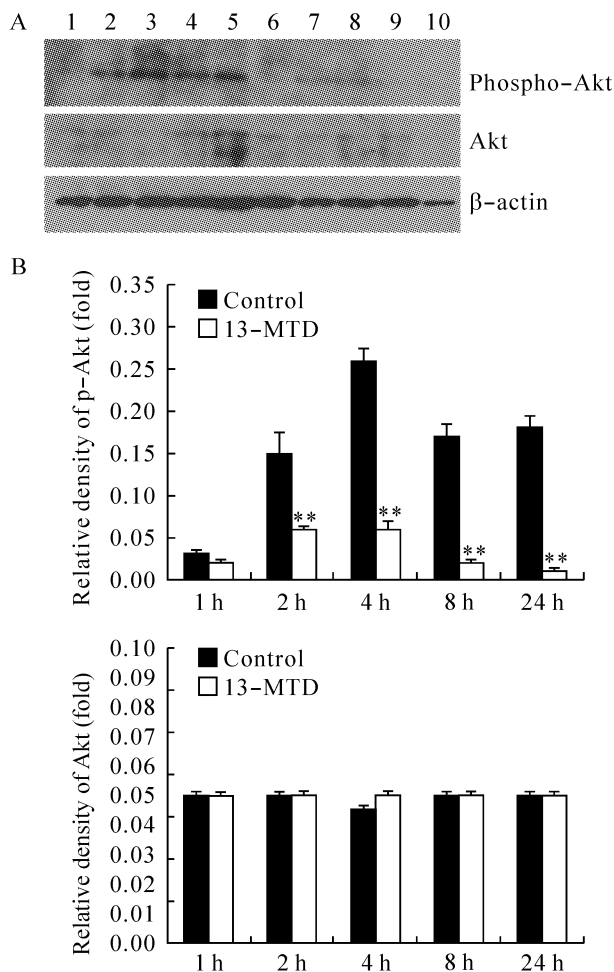


Fig 3 Western blotting results for Akt in MCF - 7 cells. MCF - 7 cells were treated with solvent (lanes 1, 2, 3, 4, and 5) and with 13 - MTD (lanes 6, 7, 8, 9, and 10) for 1, 2, 4, 8, and 24 h respectively. The figure showed decreased level of Akt phosphorylation in MCF - 7 cells after incubated with 13 - MTD comparing with control. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 3 MCF - 7 细胞中 Akt 免疫印迹结果

讨 论

近年来肿瘤的发病机制的基础研究取得了很大的发展,恶性肿瘤的形成是一个与基因密切相关的多步骤的过程,在这过程中,逃避细胞凋亡是一个很重要的环节,几乎所有的恶性肿瘤都具有该特性^[7]。因此,进一步研究凋亡在肿瘤中的作用机制,揭示肿瘤凋亡的信号转导途径并发现新的靶目标,成为肿瘤防治的重要内容。最近许多体内和体外研究表明化疗药物能诱导多种不同肿瘤细胞的凋亡,但是绝大多数化疗药物有对人体和动物难以忍受的毒副作用,因此,努力发现新的安全有效的抗肿瘤药物具有重要的意义^[8]。

13 - MTD 是近年来发现的一个新的抗肿瘤药物,研究结果显示其能诱导膀胱癌细胞、前列腺癌细

胞、胃癌细胞、肝癌细胞等多种癌细胞的凋亡。我们通过流式细胞仪检测技术进一步证实了 13 - MTD 能有效地诱导人乳腺癌细胞的凋亡,但不作用于人乳腺正常上皮细胞。因此,13 - MTD 是一个新的安全高效的抗肿瘤药物。

细胞凋亡是一个复杂的过程,是细胞信号转导,生化改变,酶激活以及基因调控多方面联合作用的结果。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen - activated protein kinases, MAPK)是生物体内重要的信号转导系统,是信号从细胞表面转导到细胞核内部的重要传递者。MAPK 的功能涉及一系列生理过程,包括细胞生长、分化和凋亡。目前已经在哺乳动物细胞克隆和鉴定了细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal - regulated protein kinase, ERK)、c - Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 和 ERK5 或 BMK1 等 4 个 MAPK 亚族,JNK 和 p38 信号通路是 MAPK 中重要的通路。在细胞外多种应激原如放射线、紫外光、热休克、药物、高渗液和促炎因子(如 TNF - α , IL - 1)作用下,可使它们通过磷酸化而激活,参与细胞应激诱导的细胞凋亡^[9-11]。

我们用磷酸化抗体通过免疫印迹实验发现 13 - MTD 处理后乳腺癌细胞 JNK 和 p38 MAPK 激酶活性强且持续性激活(图 2)。JNK 和 p38 激酶的磷酸化发生在 13 - MTD 处理后的 1 h 内。JNK 和 p38 激酶活性与凋亡的诱导相一致。我们的结果表明 JNK 和 p38 激酶的激活是 13 - MTD 激活凋亡信号途径级联反应的一个早期步骤,同时表明 JNK 和 p38 激酶的激活不受死亡受体,Fas 受体途径的调节,因 13 - MTD 处理肿瘤细胞后没有检测到 Fas 相关死亡区域蛋白(FADD)的磷酸化激活(图 2)。

凋亡也能通过调节存活途径中的蛋白如 PI3 激酶、Akt 和 PTEN 的活性而得到诱导^[12,13]。胰岛素和不同的生长刺激因子能激活 PI3 激酶途径再激活 Akt,Akt 通过磷酸化使 Bad、forkhead 转录因子、caspase - 9、Gsk - 3 等失活而使细胞存活,抑制凋亡,PTEN 是 PI3/Akt 一个重要的负性调节因素。

13 - MTD 处理后的乳腺癌细胞株 MCF - 7 中,Akt 磷酸化下降(图 3),从而细胞存活减少,诱导凋亡。我们的研究表明 13 - MTD 诱导肿瘤细胞凋亡的一个机制是下调存活信号途径。

总而言之,13 - MTD 能有效地诱导肿瘤细胞的凋亡,而不作用于正常细胞。13 - MTD 诱导人乳腺癌细胞的凋亡是通过激活 MAPK 凋亡途径和下调 Akt 存活途径实现的。我们的研究为 13 - MTD 的临床运用奠定了理论基础。

[参 考 文 献]

[1] Chow LWC, Loo WTY. The differential effects of cyclo-

phosphamide: epirubicin - and 5 - fluorouracil on apoptotic marker (CPP - 32), proapoptotic protein (p21 - waf - 1) and anti - apoptotic protein bel - 2 in breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 80 (3):239 - 244.

[2] Gonzalez - Angulo AM, Morales - Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 608 (1):1 - 22.

[3] Yang Z, Liu S, Chen X, et al. Induction of apoptotic cell death and *in vivo* growth inhibition of huamn cancer cell by a saturated branched - chain fatty acid, 13 - methyl - tetradecanoic acid [J]. Cancer Res, 2000, 60 (3):505 - 509.

[4] Calviello G, Palozza P, Maggiano N, et al. Cell proliferation, differentiation, and apoptosis are modified by n - 3 polyunsaturated fatty acids in normal colonic mucosa [J]. Lipids, 1999,34(6):599 - 604.

[5] Ip MM, Masso - Welch PA, Shoemaker SF, et al. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture[J]. Exp Cell Res, 1999, 250(1): 22 - 34.

[6] Wongtangintharn S, Oku H, Iwasaki H, et al. Incorporation of branched - chain fatty acid into cellular lipids and caspase - independent apoptosis in human breast cancer cell line, SKBR - 3 [J]. Lipids Health Dis, 2005, 4 (11):29.

[7] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer[J]. Cell, 2000, 100(1):57 - 70.

[8] 黄红艺,杨冬梓. 促性腺激素释放激素类似物对乳腺癌细胞株化疗敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008,24(5):986 - 991.

[9] Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen - activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers [J]. Mol Cell Biol, 1999,19(4): 2435 - 2444.

[10] Ana C, Luis F, Laura G, et al. Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (1):241 - 250.

[11] 竺可青,余应年,章锁江. MNNG 对哺乳类细胞 JNK/SAPK 及 p38MAPK 作用及其信号源研究 [J]. 中国病理生理杂志,2003,19(4):433 - 437.

[12] Karthikeyan K, Rakesh KS. Role of the phosphatidylinositol 3' - kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand - induced apoptosis in non - small cell lung cancer cells [J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 4929 - 4937.

[13] Marty B, Maire V, Gravier E, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated PI3K pathway in basal - like breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(6): R101.