

· 药物研究 ·

## PD98059 对乳腺癌细胞的抗癌效应

陈 敏, 钟 刚, 郑红兵, 濮德敏, 万 芳, 关艳梅

( 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科, 武汉 430030 )

**[摘要]** 目的 研究 PD98059 对乳腺癌细胞株的抗肿瘤效应。方法 用  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PD98059 处理乳腺癌细胞系 MCF-7( ER + /PR + ) 和 MDA-MB-435s( ER - /PR - ) 1 h 后, 采用逆转录酶-聚合酶链反应( RT-PCR ) 检测 AP-1、cyclin D<sub>1</sub> 的 mRNA 水平, 采用 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡, PI 染色流式细胞仪检测细胞周期。结果 PD98059 明显抑制两种乳腺癌细胞的 AP-1 和 cyclin D<sub>1</sub> 的 mRNA 水平, 促进两种细胞的凋亡, 并阻滞两种细胞的 G<sub>1</sub>/S 期转换。结论 PD98059 对乳腺癌细胞具有明显的抗肿瘤效应, 可能成为乳腺癌靶向性化疗新药。

**[关键词]** PD98059; 乳腺癌细胞; 抗肿瘤效应; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R979.1; R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781( 2005 )06-0457-03

### The Anticancer Effect of PD98059 on Breast Cancer Cells

CHEN Min, ZHONG Gang, ZHENG Hong-bing, PU De-min, WAN Fang, GUAN Yan-mei( *Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China* )

**ABSTRACT Objective** To study the anticancer effect of PD98059 on human breast cancer cell lines. **Methods** Human breast cancer cells MCF-7( ER + /PR + ) and MDA-MB-435s( ER - /PR - ) were treated with  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PD98059 for 1 h, and the mRNA levels of AP-1 and cyclin D<sub>1</sub>, apoptosis and the cell cycle of the cancer cells were then assayed with RT-PCR, Annexin V/PI method and color flow cytometry, respectively. **Results** PD98059 was shown to exert striking inhibitory effect on the mRNA levels of AP-1 and cyclin D<sub>1</sub>. It also promoted apoptosis and blocked the G<sub>1</sub>/S cycle conversion of both kinds of cancer cells. **Conclusion** PD98059 was shown to have dramatic antineoplastic effects on human breast cancer cells and may become a potential chemotherapeutic drug for breast cancer.

**KEY WORDS** PD98059; Breast cancer cell; Anti-neoplastic activity; Apoptosis

传统的化疗药物属于细胞毒药物, 可作用于包括癌细胞在内的几乎所有生长旺盛的细胞, 而内分泌治疗药物如他莫昔芬( tamoxifen, TAM ) 对于约 90% 雌激素受体( estrogen receptor, ER ) 阴性乳腺癌细胞以及约 10% 的 TAM 耐药的 ER 阳性乳腺癌细胞则无效。现在信号转导途径、新生血管、端粒酶等诸多药物靶点成为关注的焦点。大量资料表明, 细胞外信号调节激酶( extracellular signal-regulated kinase, MEK/ERK ) 信号转导途径的异常激活在乳腺癌的发病机制中起关键作用<sup>[1-3]</sup>。本实验中笔者将丝裂原活化蛋白激酶激酶-1( mitogen activated protein kinase kinase-1, MEK ) 抑制剂 PD98059 作用于 MCF-7( ER + /PR + ) 及 MDA-MB-435s( ER - /PR - ) 两种人乳腺癌细胞系的实验研究来探讨 PD98059 体外抗癌效应及其成为乳腺癌靶向性化疗新药的前景。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料 人乳腺癌细胞系 MCF-7( ER + /PR + ) 和

MDA-MB-435s( ER - /PR - ) 均购自中国科学院上海细胞生物研究所。PD98059、M-MLV 逆转录酶系由 Promega 生产, EGF、IGF-1 系由 PeproTech EC LTD 生产。Taq 酶、DL2000 购自 TAKARA, Annexin V-FITC 系为 Bender medsystem 产品, c-fos、c-jun、cyclin D<sub>1</sub>、GADPH 均由上海博亚公司合成, Trizol 系由 Invitrogen 公司生产。

**1.2 细胞处理** DMEM 高糖培养基( 含 10% 胎牛血清 ) 置于 37℃、5% 二氧化碳( CO<sub>2</sub> ) 培养箱中, 胰酶消化并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 置于 6 孔板培养 24 h 后换为无血清 DMEM 继续培养, 48 h 后将每种细胞分为两组: A 组, 空白组; B 组,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PD98059 1 h。

**1.3 逆转录酶-聚合酶链反应( RT-PCR )** 按 Trizol 试剂盒说明提取 RNA, 紫外分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度后, 取总 RNA 2  $\mu\text{g}$  加至 RT 反应体系 20  $\mu\text{L}$  中 37℃ 逆转录 1 h 后, 95℃、5 min 灭活逆转录酶。PCR 反应体系( 相应引物序列见表 1 ): 10  $\times$  Buffer 3  $\mu\text{L}$ , Mg<sup>2+</sup> 1.8  $\mu\text{L}$ , dNTP( 10 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  ) 0.75  $\mu\text{L}$  引物( 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) 上下游各 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 3  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 加水至总体积 30  $\mu\text{L}$ 。94℃ 预变性 5 min 后, 94℃

**[收稿日期]** 2004-04-08 **[修回日期]** 2004-06-03

**[作者简介]** 陈 敏( 1978 - ), 女, 湖北十堰人, 住院医师, 硕士, 研究方向: 乳腺癌细胞信号转导途径。联系电话: 027 - 83662878, E-mail: coffeebeanchen@163.com。

30 s, 52℃ 30 s, 70℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 1 min。PCR 产物鉴定: 2% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳(75V)25 min。紫外灯透射仪下观察结果, 计算机成像及分析系统扫描分析各条带面积灰度值, 以目的基因与内参 GADPH 条带的面积灰度比值来半定量目的基因 mRNA 的表达。

表 1 内参及目的基因引物表

内参	目的基因引物
GADPH	上游引物 5' ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G 3' (212 bp) 下游引物 5' CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG 3'
c-fos	上游引物 5' GGG CAA GGT GGA ACA GT 3' (444 bp) 下游引物 5' AAC AGG AAG TCA TCA AAG G 3'
c-jun	上游引物 5' GCG TCT TAG GCT TCT CC 3' (372 bp) 下游引物 5' TCC CGC ACT CTT ACT TG 3'
cyclin D <sub>1</sub>	上游引物 5' AAT AGG TGT AGG AAA TAG CG 3' (641 bp) 下游引物 5' AGA TGA CTC TGG GAA ACG 3'

**1.4 流式细胞术** 取 A、B 两组细胞检测。胰酶消化成单个悬浮细胞, PBS 冲洗离心, 再将每组细胞各分成两管。一管用于 Annexin V-FITC 碘化丙啶(PI)双染检测细胞凋亡。按试剂盒说明操作如下: Binding Buffer 调整细胞密度(2~5) × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>, 将细胞悬液 195 μL 与 Annexin V-FITC 5 μL 及(20 μg · mL<sup>-1</sup>)PI 10 μL 混合, 室温下避光孵育 30 min, 上样检测。另一管用 PI 染色测细胞周期: 调节细胞密度为(2~5) × 10<sup>6</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>, 加入预冷的 75% 乙醇溶液 2 mL, 4℃ 过夜, PBS 洗涤离心, 再用 PBS(含 PI 250 μg, RNA 酶 100 U)1 mL 4℃ 避光染色 1 h, 上样检测。

**1.5 统计学方法** 两种细胞的所有处理组均取 3 个复孔, 收集每组细胞后, 每孔提取得 RNA 取等量混匀后进行 RT-PCR, 故其结果相当于均值。不作统计分析。流式术所用细胞亦同样在调节每孔细胞密度接近一致后取等量混匀, 再上样检测, 此结果也相当于均值, 也不做统计分析。

**2 结果**

**2.1 RT-PCR 结果分析** 与空白组相比, PD98059 显著地降低两种细胞的 cyclin D<sub>1</sub>、c-jun、c-fos 的 mRNA 水平(表 2)。

表 2 MDA-MB-435s 和 MCF-7 的对照组与 PD98059 组的目的基因 mRNA 相对表达水平

组别	c-fos/ GADPH	cyclin D <sub>1</sub> / GADPH	c-jun/ GADPH
	435s 空白组	0.347	0.199
435s PD98059 组	0.047	0.042	0.031
MCF-7 对照组	0.449	0.180	0.213
MCF-7 PD98059 组	0.129	0.055	0.012

**2.2 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡** 与对照组相比, 两种细胞的 PD98059 组的凋亡率有明显的提高(表 3)。

表 3 Annexin V/PI 法检测 MDA-MB-435s 和 MCF-7 的空白组与 PD98059 组的凋亡结果

组别	机械性损伤 (An-/PI+)	坏死 (An+/PI+)	活细胞 (An-/PI-)	凋亡细胞 (An+/PI-)
	435s 空白组	2.50	18.53	76.14
435s PD98059 组	2.23	14.65	66.63	16.50
MCF-7 空白组	22.62	4.70	70.60	2.09
MCF-7 PD98059 组	3.65	21.33	59.01	15.71

注: An 为 Annexin-V

**2.3 PI 染色检测细胞周期** 两种细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数目增多, 但 S 期细胞数目下降, 而 G<sub>2</sub>/M 期的细胞数目变化不大(表 4), 故 PD98059 能将两种细胞均阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。这与 PD98059 能阻滞 cyclin D<sub>1</sub> 的表达效应相一致。

表 4 PI 法检测 MDA-MB-435s 和 MCF-7 的空白组及 PD98059 组的细胞周期

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
435s 空白组	60.98	27.73	12.29
435s PD98059 组	72.26	3.50	24.24
MCF-7 空白组	51.67	41.00	7.23
MCF-7 PD98059 组	63.90	27.88	8.22

**3 讨论**

MEK/ERK 信号转导途径可被广泛的胞外信号如性激素(E<sub>2</sub>), 生长因子(EGF、IGF-1、TGF、PDGF), 细胞因子(IL-3)和整合素激活<sup>[1,4]</sup>, 并产生广泛而复杂的下游效应。其可激活或灭活其他信号转导途径的关键效应分子(如 NF-KB、Akt、CREB 等)以及重要的转录因子(Ets、AP-1、c-myc), 并能调节细胞周期相关因子(cyclin D<sub>1</sub>、Rb、p21)和凋亡分子(bcl-2、bcl-XL、FasL)的表达<sup>[2]</sup>。

AP-1 即早基因, 是由 c-fos 和 c-jun 形成的二聚体。其作为一种转录因子, 可与多种基因的上游启动子相结合, 从而控制了许多癌基因的表达, 诸如 c-jun、cyclin D<sub>1</sub>、cyclin A、p53、p16、IL-2、IL-3 和 GM-CSF 等<sup>[2]</sup>。Cyclin D<sub>1</sub> 是细胞周期中第一个且最重要的周期素, 直接决定细胞是否能通过 G<sub>1</sub> 期限制点(checkpoint)而进入 S 期, 从而对细胞增殖起关键性的调控作用。本实验表明, PD98059 能显著降低两种细胞的 AP-1、cyclin D<sub>1</sub> 的 mRNA 表达。这表明 AP-1、cyclin D<sub>1</sub> 的转录受到 MEK/ERK 通路的调控, 一旦此通路受到抑制, 其转录水平也明显受到抑制。Chen 等<sup>[3]</sup>指出 MEK/ERK 主要在转录水平调控 c-fos 的活

性,而对于 c-jun, MEK/ERK 既存在着转录水平又存在着转录后水平的调控,同时 MEK/ERK 也能在转录后的各个水平调节 cyclin D<sub>1</sub> 的表达。PD98059 还显著提高两种细胞的凋亡率,这可能因为 PD98059 能抑制下游抗凋亡分子( bcl-2、bcl-XL、FasL、Mcl-1 )的表达和活性并调控 Caspase 家族的表达与活性。PD98059 也能抑制两种细胞的 G<sub>1</sub>/S 期的转换,这与 PD98059 下调了 cyclin D<sub>1</sub>、cyclin E 以及调节 p21 和 p27 的表达和活性有关。

免疫组化研究发现,与正常乳腺组织相比,乳腺癌组织中 MAPK 蛋白的表达明显增高<sup>[5]</sup>,且磷酸化的 MAPK( p-MAPK )阳性表达也明显增加<sup>[6]</sup>。同时,与良性肿瘤相比,乳腺癌 MAPK 的酪氨酸位点明显磷酸化且活性超过良性肿瘤的 5~10 倍。因此 MEK 抑制药如具有明显的乳腺癌抗癌效应,就可能替代细胞毒药物而成为一种毒性更小且靶向性更高的抗癌新药。本实验结果表明,PD98059 对乳腺癌细胞有明显的抗癌作用,同时这种抗癌效应不仅体现在 ER( + )的细胞株 MCF-7 上,对侵袭性更强的 ER( - )的细胞株 MDA-MB-435s 也出现明显的抗癌效应,从而表明这种 MEK 抑制药可以突破以往的内分泌治疗的局限性。PD98059 最终的体内效应还有待进一步的探究,但随着某些其他激酶的抑制药已经进入临床试验阶段<sup>[7]</sup>, PD98059 可能会作为一种潜在的乳腺癌靶向性化疗新药而具有广泛的应用前景。

#### [参考文献]

[1] Duan R, Xie W, Burghardt R C, et al. Estrogen receptor-

mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1 [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276( 15 ): 11590 - 11598.

[2] Chang F, Steelman L S, McCubrey J A, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention [ J ]. *Leukemia*, 2003, 17( 7 ): 1263 - 1293.

[3] Chen J, Fujii K, Fu H, et al. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98( 14 ): 7783 - 7788.

[4] Lee A V, Cui X, Oesterreich S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7( 12 Suppl ): 4429 - 4435.

[5] Coutts A S, Murphy L C. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 1998, 58( 18 ): 4071 - 4074.

[6] Gee J M, Robertson J F, Ellis I O, et al. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer [ J ]. *Int J Cancer*, 2001, 95( 4 ): 247 - 254.

[7] Kelland L R, Smith V, Valenti M, et al. Preclinical anti-tumor activity and pharmacodynamic studies with the farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in human breast cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7( 11 ): 3544 - 3550.

## 利多卡因在人肝微粒体中的体外生物转化

张顺国,唐跃年,李 方

(上海第二医科大学附属新华医院药剂科,200092)

[摘要] 目的 建立人肝微粒体体外生物转化利多卡因的方法。方法 分别改变反应体系中人肝微粒体的浓度、生物转化时间、利多卡因的浓度,以高效液相色谱(HPLC)法测定利多卡因及其代谢产物单乙基甘氨酸二甲基苯酰胺(MEGX)和甘氨酸二甲基苯酰胺(GX)的含量。结果 最佳的生物转化条件为:2.0 mg·L<sup>-1</sup>利多卡因在1.0 g·L<sup>-1</sup>微粒体中,生物转化60 min。结论 该方法快速有效,可用于利多卡因在人肝微粒体体外代谢的研究。

[关键词] 利多卡因;单乙基甘氨酸二甲基苯酰胺;甘氨酸二甲基苯酰胺;人肝微粒体;高效液相色谱法

[中图分类号] R972.2;R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2005)06-0459-03

### In Vitro Biotransformation of Lidocaine in Human Liver Microsomes

ZHANG Shun-guo, TANG Yue-nian, LI Fang ( Department of Pharmacy, Xinhua Hospital Affiliated with the Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China )

**ABSTRACT Objective** To set up a method for assaying the in vitro biotransformation of lidocaine in human liver microsomes. **Methods** The concentration of human liver microsomes, the incubation time and the concentration of lidocaine