

紫杉醇 顺铂对HCC1937人乳腺癌细胞MAPK信号通路影响*

查全斌^① 张 华^② 唐金海^② 吴建中^③ 季明华^④

摘要 目的:研究紫杉醇、顺铂对BRCA1基因缺陷型三阴性乳腺癌细胞HCC1937的增殖抑制作用及与MAPK信号通路的关系。**方法:**采用CCK-8试剂盒检测紫杉醇、顺铂分别对HCC1937细胞、MCF-7细胞的50%抑制浓度(IC₅₀);采用流式细胞仪和Western blot分别检测两药作用HCC1937细胞48 h后的细胞周期和MAPK通路蛋白表达状况。**结果:**HCC1937细胞(IC₅₀ 6~9 μg/mL)对顺铂敏感性显著高于MCF-7细胞(IC₅₀ 18~20 μg/mL)(*P*<0.01);而HCC1937细胞(IC₅₀ 3~4.6 μg/mL)对紫杉醇的敏感性则明显低于MCF-7细胞(IC₅₀ 0.12~0.3 μg/mL)(*P*<0.01)。紫杉醇使HCC1937细胞阻断在G₂~M期,呈剂量-效应趋势,顺铂使其阻断在G₀/G₁期;紫杉醇、顺铂作用HCC1937细胞48 h后,P-JNK和P-P38蛋白表达显著增加,顺铂组P-ERK蛋白表达较对照组明显降低。**结论:**1)三阴性乳腺癌细胞HCC1937对顺铂的敏感性明显优于紫杉醇;2)紫杉醇、顺铂皆可激活HCC1937细胞JNK/SAPK、P38通路,同时不同浓度的顺铂可以抑制ERK通路激活。

关键词 紫杉醇 顺铂 HCC1937细胞 MAPK信号通路

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.19.002

Role of the MAPK Signal Pathway in Paclitaxel- and Cisplatin-induced Apoptosis in HCC1937 Breast Cancer Cells

Quanbin ZHA¹, Hua ZHANG², Jinhai TANG², Jianzhong WU³, Minghua JI⁴

Correspondence to: Jinhai TANG; E-mail: zgziwkzz@139.com

¹Department of Oncology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

²Department of Breast Surgery, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

³Department of Scientific Research, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

⁴Department of Radiation Oncology, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30840093)

Abstract Objective: This study aimed to investigate the inhibitory effects of paclitaxel and cisplatin against the triple-negative breast cancer cell line HCC1937 in vitro, and to explore the underlying mechanisms in relation to the MAPK signaling pathway. **Methods:** A Cell Counting Kit-8 assay was used to detect the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of paclitaxel and cisplatin on HCC1937 and MCF-7 cells. Flow cytometry and Western blot analysis were used to determine the cell cycle distribution and MAPK signaling pathway protein expression after incubating the HCC1937 cells with paclitaxel or cisplatin for 48 h. **Results:** The HCC1937 cells were significantly more sensitive to cisplatin (IC₅₀ = 6-9 μg/ml) than MCF-7 cells (IC₅₀ = 18-20 μg/ml) (*P* < 0.01), whereas the HCC1937 cells were less sensitive to paclitaxel (IC₅₀ = 3-4.6 μg/ml) than the MCF-7 cells (IC₅₀ = 0.12-0.3 μg/ml) (*P* < 0.01). Paclitaxel caused the MCF-7 cells to arrest at the G₂/M phase in a concentration-dependent manner, whereas cisplatin acted by arresting cells at the G₀/G₁ phase. P-JNK and P-P38 protein expression significantly increased after the cells were treated with the two drugs for 48 h compared with the control group. However, P-ERK protein expression in the cisplatin group was significantly lower than in the control group for the HCC1937 cells. **Conclusion:** HCC1937 cells have higher chemosensitivity to cisplatin than to paclitaxel. Paclitaxel and cisplatin can both activate the JNK/SAPK and P38 signaling pathways in HCC1937 cells, whereas different cisplatin concentrations can inhibit the activation of the ERK signaling pathway.

Keywords Paclitaxel; Cisplatin; HCC1937 cells; MAPK signal pathway

三阴性乳腺癌是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(CerbB-2)均为阴性的乳腺癌,约占乳腺癌的15%^[1]。这类乳腺癌具有相似的特征、极高的同源性,组织分化往往较差,多属

于基底样乳腺癌,与乳腺癌易感基因-1(BRCA1)相关性乳腺癌具有许多相似性^[2]。三阴性乳腺癌与BRCA1相关性乳腺癌的发病机理具有众多相似分子学特征。两者不仅预后均较差,而且还有相似的

作者单位:①徐州医学院肿瘤学教研室(江苏省徐州市221004);②江苏省肿瘤医院乳腺外科;③科研科;④放疗科

*本文课题受国家自然科学基金(编号:30840093)资助

通信作者:唐金海 zgziwkzz@139.com

分子特征、发病途径和遗传性改变^[3]。由于缺乏针对这种特殊类型乳腺癌的治疗指南,目前仍按常规标准方式进行治疗,但效果不佳,局部复发和远处转移率均较高。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内重要的信号转导途径,在细胞的恶性转化和肿瘤的发生发展中起重要作用,包括4个成员:ERK、P38、JNK、ERK5^[4]。近来发现,MAPK与乳腺癌发生机制密切相关,从而使MAPK通路在临床上可作为一个潜在的分子治疗靶。HCC1937人乳腺癌细胞是BRCA1基因缺失的三阴性乳腺癌细胞,因此本实验通过在体外寻找紫杉醇、顺铂对该类特殊类型的乳腺癌细胞适宜剂量浓度,初步探讨其与MAPK通路之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 HCC1937细胞、MCF-7细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,紫杉醇注射液购自四川太极制药有限公司(30 mg/5mL),顺铂注射液(10 mg)购自江苏豪森药业股份有限公司;RPMI 1640、高糖DMEM培养液、FBS均购自GIBCO公司,CCK8试剂盒购自凯基科技生物发展有限公司;内参购自Millipore公司;兔抗P-ERK1/2、ERK1/2、P-JNK/SAPK、JNK/SAPK、P-p38为Cell Signaling公司产品;Western blot仪器为美国Bio-Rad公司制造,ECL发光试剂为Millipore公司产品。

1.1.2 细胞及培养方法 HCC1937细胞、MCF-7细胞分别给予含10%FBS的RPMI medium 1640培养液,10%FBS的高糖DMEM培养液,37℃5%CO₂饱和湿度的恒温培养箱内传代培养,待细胞生长至对数期时加药。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK8法 检测紫杉醇、顺铂对HCC1937细胞、MCF-7细胞毒性 1)将HCC1937细胞、MCF-7细胞分别用0.25%的胰酶消化后按照每孔 5×10^4 个和 1×10^4 个细胞接种到96孔板,在37℃、5%CO₂的培养箱中培养24 h;2)待细胞贴壁后,按0、0.01、0.1、1、10、50、100 μg/mL浓度的紫杉醇,顺铂100 μL加入培养孔,每个培养条件重复3个孔,设3个对照孔,孵育48 h后测450 nm的OD值。

1.2.2 实验分组 实验分为紫杉醇组和顺铂组,细胞生长至对数期,分别以0、0.625、1.25、2.5、5 μg/mL的紫杉醇作用HCC1937细胞,以0、2、4、6、8 μg/mL的顺铂作用HCC1937细胞48 h后收获以测细胞周期和Western blot。

1.2.3 细胞周期的测定 用2 mL离心管取 1×10^5 个

细胞,加生理盐水1 mL以1 200 rpm离心5 min,重复3次;加100 μL 0.9%NaCl,混匀,加入1 mL 70%酒精固定;4℃,溴化碘啶染液染色30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 Western blot 蛋白印迹

收获细胞后加入预冷至0℃的裂解液裂解细胞30 min后,4℃12 000 r/min离心5 min,取上清液。考马斯亮蓝法测蛋白浓度后加1×SDS上样缓冲液,100℃煮沸5 min。每泳道加样100 μg蛋白,10%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后将电泳产物转移至硝酸纤维素膜上。用封闭液(含5%BSA)封闭2 h,加一抗稀释液(1:1 000),4℃孵育过夜。TBST洗膜5 min×3次,辣根过氧化物酶标记的二抗置室温下作用1.5 h(1:2 000),TBST洗膜5 min×3次,ECL显色2~5 min,压片。

1.4 统计学方法

使用SPSS 13.0统计学软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用方差分析(ANOVA),组间比较采用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫杉醇、顺铂对MCF-7、HCC1937细胞抑制作用 紫杉醇、顺铂对两种细胞皆有抑制作用,抑制作用随药物浓度增加而逐渐增强,呈剂量依赖性。HCC1937细胞(IC₅₀ 6~9 μg/mL)对顺铂敏感性高于MCF-7细胞(IC₅₀ 18~20 μg/mL)。而HCC1937细胞(IC₅₀ 3~4.6 μg/mL)对紫杉醇的敏感性则明显低于MCF-7细胞(IC₅₀ 0.12~0.3 μg/mL)。表明三阴性乳腺癌细胞HCC1937对抗微管类药物化疗敏感性不如导致DNA损伤的铂类药物,而ER阳性的MCF-7细胞对紫杉类药物敏感性强于铂类药物($P < 0.05$,表1)。

表1 紫杉醇、顺铂对人乳腺癌细胞MCF-7、HCC1937细胞IC₅₀对比 $\bar{x} \pm s$

Table 1 Comparison of the IC₅₀ values of paclitaxel and cisplatin on HCC1937 and MCF-7 cells

IC ₅₀ (μg/mL)	MCF-7	HCC1937
紫杉醇	0.21 ± 0.05*	3.69 ± 0.49
顺铂	19.26 ± 1.11*	7.62 ± 0.97

*紫杉醇、顺铂对MCF-7细胞的IC₅₀与HCC1937细胞相比较, $P < 0.01$

2.2 流式细胞技术检测细胞周期变化结果

在紫杉醇达到细胞50%抑制浓度前,随药物浓度增加,G₀~G₁、S期细胞逐渐减少,G₂~M期细胞明显增多,呈剂量-效应趋势。顺铂使HCC1937阻断在G₀/G₁期,随浓度增加,S期有所增加,G₂/M期缩短,细胞周期的改变与药物浓度之间未发现相关性(表2,3)。

表2 不同浓度紫杉醇对HCC1937细胞周期的影响

Table 2 Cell cycle distribution after HCC1937 cells were treated with different paclitaxel concentrations

细胞周期(μg/mL)	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
0	37.26 ± 1.71	47.91 ± 0.15	14.83 ± 1.55
0.625	35.08 ± 2.07	22.07 ± 1.07*	42.87 ± 1.01* [△]
1.25	20.13 ± 0.9* [△]	28.28 ± 1.09*	51.58 ± 1.02* [△]
2.5	8.55 ± 0.46* [△]	17.21 ± 0.56*	74.14 ± 1.01*
5	6.42 ± 0.66*	19.20 ± 1.12*	74.33 ± 1.78*

*加药组与不加药组比较, $P < 0.05$; *[△]与各浓度组间比较, $P < 0.05$

表3 不同浓度的顺铂对HCC1937细胞周期的影响

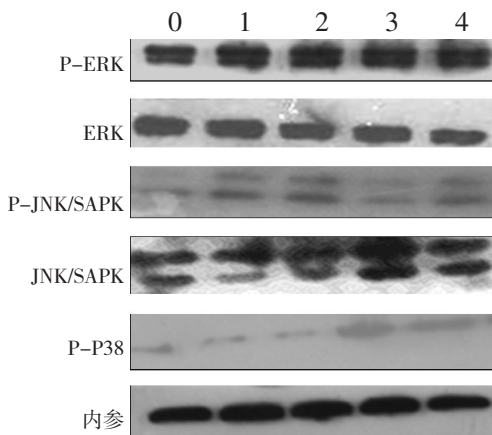
Table 3 Cell cycle distribution after HCC1937 cells were treated with different cisplatin concentrations

细胞周期(μg/mL)	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
0	37.26 ± 1.71	47.91 ± 0.15	14.83 ± 1.55
2	45.5 ± 0.75*	48.45 ± 0.29	6.01 ± 0.82*
4	44.3 ± 0.5*	51.47 ± 0.63	4.21 ± 0.19*
6	38.3 ± 0.52	56.26 ± 0.27*	5.43 ± 0.77*
8	41.37 ± 0.20	54.01 ± 0.13*	4.62 ± 0.30*

*加药组与不加药组比较, $P < 0.05$

2.3 紫杉醇对HCC1937细胞MAPK通路蛋白的影响

紫杉醇作用细胞48h后,加药组P-JNK和P-P38蛋白表达较对照组增加,各浓度组P-JNK/SAPK表达无明显差异,2.5、5 μg/mL两组P-P38蛋白表达较0.625、1.25 μg/mL两组显著增加。各浓度组P-ERK、ERK、JNK/SAPK蛋白表达较对照组无明显差异(图1)。



0、1、2、3、4分别代表用紫杉醇浓度为0、0.625、1.25、2.5、5 μg/mL

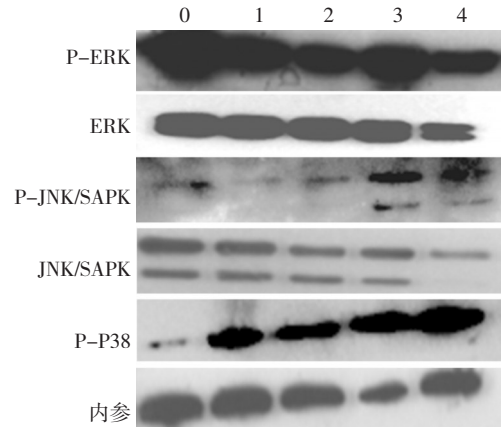
图1 不同浓度紫杉醇作用HCC1937细胞48h后MAPK通路蛋白表达的影响

Figure 1 MAPK pathway protein expression after HCC1937 cells were treated with paclitaxel for 48 h

2.4 顺铂对HCC1937细胞MAPK通路蛋白的影响

加药组P-JNK蛋白表达较对照组增加,2.5、5 μg/mL两组P-JNK/SAPK蛋白表达较0.625、1.25 μg/mL两组显

著增加。随顺铂浓度增加P-P38蛋白表达明显增加,而P-ERK蛋白表达较对照组降低。各浓度组P-ERK、ERK、JNK/SAPK蛋白表达较对照组无明显差异(图2)。



0、1、2、3、4分别代表用顺铂浓度为0、2、4、6、8 μg/mL

图2 不同浓度顺铂作用HCC1937细胞48h后MAPK通路蛋白表达的影响

Figure 2 MAPK pathway protein expression after HCC1937 cells were treated with cisplatin for 48 h

3 讨论

本实验发现紫杉醇可以抑制人乳腺癌细胞HCC1937增殖,但其抑制作用较ER阳性的MCF-7细胞显著降低,而该细胞对顺铂的敏感性明显高于MCF-7细胞。BRCA1和BRCA2同为抑癌基因,二者突变皆可造成乳腺癌的发病风险增加,BRCA1主要功能是维持基因组的稳定性,既可以感知又能传送DNA损伤信息,同时起着DNA局部修复作用^[5]。顺铂作为一种周期非特异性药物,与细胞内DNA链上的碱基作用,可引起DNA复制障碍。因此对于BRCA1基因缺失的乳腺癌细胞顺铂的敏感性更强。该结果与Tassone等^[6]报道的结果一致,其发现HCC1937细胞对阿霉素类的药物的敏感性同样低于MCF-7细胞和激素依赖性不敏感的MDA-MB-231细胞。研究显示BRCA1相关性乳腺癌对双功能烷化剂、铂类等可引起链间交联的药物和对依托泊、博来霉素等可引起DNA双链断裂的药物极其敏感,但对抗有丝分裂纺锤体药物如紫杉醇类、长春新碱类药物耐药^[7]。由此通过抑制BRCA1基因的活性来增加细胞对铂类药物的敏感性可能会成为临床上乳腺癌治疗的一种有效手段。

虽然HCC1937细胞对紫杉醇的敏感性不强,细胞周期变化仍呈现剂量效应关系。G₀~G₁、S期细胞随浓度增加逐渐减少,G₂~M期细胞逐渐增多。这与紫杉醇作为其他癌细胞的杀伤机制并无明显不同,癌细胞分裂停滞于G₂/M期直至死亡。顺铂作用HCC1937细胞后,细胞阻断在G₀/G₁期,随着浓度的增加,S期有所增加,G₂/M期缩短,细胞周期的改变与药

物浓度之间没有发现相关性。BRCA1能够调节S、G₁和G₂M检测点从而保证发生了DNA损伤的细胞不发生复制^[5]。顺铂引起DNA损伤,通过P53依赖途径诱导CDK抑制因子的激活,抑制CDK表达,继而使细胞阻断在G₂/M期。该过程中可能BRCA1基因缺失与铂类存在交叉,共同作用细胞周期,同时与BRCA1基因缺陷或失活程度也可能有关^[8]。

本研究发现,紫杉醇、顺铂均可诱导HCC1937细胞P-JNK/SAPK和P-P38蛋白表达显著增加,顺铂随浓度增加还可以抑制P-ERK蛋白表达。MAPK通路是细胞对顺铂反应的重要调节因素,但是其触发机制目前仍不清楚。顺铂可使癌细胞线粒体内产生活性氧(ROS),激活JNK与P38MAPK氧化应激激酶途径而使细胞凋亡,激活ERK信号途径可能利于细胞生存^[9]。顺铂缓慢而持久的激活SAPK/JNK, JNK活化后又可以增强细胞对顺铂的敏感性,减轻顺铂的耐药性^[10]。有学者研究顺铂诱导SAPK/JNK激活可能是结肠腺癌细胞株死亡的关键凋亡介导因子^[11]。由此,顺铂和MAPK途径间存在相互作用,从而影响细胞的增殖和凋亡。虽然对细胞杀伤作用不如顺铂明显,但紫杉醇仍可激活JNK通路, JNK激活能使线粒体释放细胞色素C并介导Bax磷酸化使之激活,还可介导Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1磷酸化使之失活,从而调节凋亡的发生^[12]。另外,三阴性乳腺癌和BRCA1基因缺失乳腺癌常表达c-myc且p53常发生突变,张丽敏等^[13]发现多西紫杉醇和顺铂联合后由于抑制了肿瘤细胞癌基因c-myc的表达可以很好地抑制MCF-7细胞的生长,而该基因参与了hTERT mRNA的表达调控,从而降低肿瘤细胞的端粒酶活性。由此可知,紫杉醇、顺铂诱导细胞的凋亡除了与MAPK通路有关外,与癌细胞受体的表达和BRCA1基因的缺失也可能有关。但是两药在诱导BRCA1基因缺失的三阴性乳腺癌细胞凋亡过程中与MAPK通路详细机制还不明确,因此深入研究该通路可能为三阴性乳腺癌的控制和治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(8): 2329-2334.
- 齐晓伟,姜 军.三阴性乳腺癌研究进展[J].中华乳腺病杂志(电子版),2008,(5):612-617.
- Miyoshi Y, Murase K, Oh K, et al. (2008) Basal-like subtype and BRCA1 dysfunction in breast cancers[J]. Int J Clin Oncol, 2008, 13(5):395-400.
- Whyte J, Bergin O, Bianchi A, et al. Key signalling nodes in mam-

- mary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(5): 209.
- 李树玲,主编.乳腺肿瘤学.第2版.北京:科学技术文献出版社,2007: 326-327.
 - Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli A, et al. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells[J]. Br J Cancer, 2003, 88(8): 1285-1291.
 - St GC, Niknejad N, Ma L, et al. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3[J]. Neoplasia, 2010, 12(7): 527-538.
 - Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin[J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(9): 749-755.
 - Schweyer S, Soruri A, Heintze A, et al. The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1671-1676.
 - Hong HY, Kim BC. Mixed lineage kinase 3 connects reactive oxygen species to c-Jun NH₂-terminal kinase-induced mitochondria apoptosis in genipin-treated PC3 human prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(2): 307-312.
 - Vasilevskaya IA, Rakitina TV, O'Dwyer PJ. Quantitative effects on c-Jun N-terminal protein kinase signaling determine synergistic interaction of cisplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines[J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(1): 235-243.
 - Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 142-149.
 - 张丽敏,洪 专.多西紫杉醇和顺铂联合用药对人乳腺癌MCF-7细胞hTERT及C-myc基因表达的影响[J].现代医学,2008,36(6):422-425.

(2011-09-27收稿)

(2012-06-09修回)

(本文编辑:杨红欣)