

文章编号: 1005-6947(2013)05-0629-04

· 基础研究 ·

c-Src 在 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达及其意义

胡浩, 顾元龙, 朱从元, 黄阿雷, 周燕娜, 李建平

(江苏省无锡市第三人民医院 普通外科, 江苏 无锡 214041)

摘要

目的: 探讨 c-Src 在乳腺癌三苯氧胺 (TAM) 中耐药的表达及意义。

方法: 用 Western blot 法检测 TAM 治疗耐药与敏感的两种人乳腺癌 MCF-7 细胞中 c-Src 的表达及其磷酸化水平; 用 c-Src 阻滞剂 PP2 处理两种细胞后, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 及吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 双荧光染色法检测细胞凋亡情况。

结果: 与 TAM 敏感 MCF-7 细胞比较, TAM 耐药 MCF-7 细胞 c-Src 的表达量及其磷酸化水平均明显增高; PP2 处理后, TAM 敏感 MCF-7 细胞的富集指数 (EF) 及细胞凋亡率高于 TAM 耐药 MCF-7 细胞 (均 $P < 0.05$)。

结论: c-Src 在 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中处于高表达及高活性状态, 并可能参与乳腺癌内分泌治疗耐药的机制。

关键词

乳腺肿瘤; 原癌基因蛋白质 pp60 (c-Src); 他莫昔芬; 抗药性; 肿瘤

中图分类号: R737.9 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.020
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3502.shtml>

Expression and significance of c-Src in human breast cancer MCF-7 cells resistant to tamoxifen therapy

HU Hao, GU Yuanlong, ZHU Congyuan, HUANG Alei, ZHOU Yanna, LI Jianping

(Department of General Surgery, Wuxi No.3 People's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214041, China)

Corresponding author: LI Jianping, Email: wx3hljp@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate c-Src expression in breast cancer resistant to tamoxifen (TAM) therapy and its significance.

Methods: The expression and phosphorylation level of c-Src in TAM-resistant and sensitive human breast cancer MCF-7 cells were detected by Western blot analysis. The apoptosis in these two cell lines was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) double fluorescent staining after treatment with c-Src inhibitor PP2.

Results: Compared with TAM-sensitive MCF-7 cells, the levels of c-Src expression and phosphorylation in

基金项目: 江苏省无锡市卫生局科研资助项目 (XM1010)。

收稿日期: 2012-12-11; 修订日期: 2013-04-22。

作者简介: 胡浩, 江苏省无锡市第三人民医院硕士研究生, 主要从事普外基础与临床方面的研究。

通信作者: 李建平, Email: wx3hljp@163.com

TAM-resistant MCF-7 cells were significantly increased. After exposure to PP2, the enrichment factor and cell apoptotic rate in TAM-resistant MCF-7 cells were significantly higher than those in TAM-sensitive MCF-7 cells (both $P < 0.05$).

Conclusion: There is a higher c-Src expression and activity in human breast cancer MCF-7 cell lines resistant to TAM therapy, which may probably be associated with the mechanism of endocrinotherapy resistance of breast cancer.

KEY WORDS Breast Neoplasms; Proto-Oncogene Proteins pp60 (c-Src); Tamoxifen; Drug Resistance, Neoplasm

CLC number: R737.9 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.020

自 20 世纪 70 年代以来, 三苯氧胺 (tamoxifen, TAM) 作为重要的内分泌治疗药物被用于雌激素受体 α (ER- α) 阳性乳腺癌的治疗, 获得了较好的临床效果。但长期应用该药后会产生内分泌治疗耐药, 且其耐药机制目前尚不十分明了。研究表明, c-Src 在曲妥单抗治疗表皮生长因子受体 2 (Her-2) 阳性的乳腺癌耐药中发挥重要作用^[1]。但其在内分泌治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达如何, 是否参与了内分泌治疗耐药? 此等问题尚未解决。为此, 本研究检测 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中 c-Src 的表达, 并应用其阻滞剂处理耐药细胞, 以期初步阐明乳腺癌内分泌治疗耐药的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

包括人乳腺癌 MCF-7 细胞株 (ATCC, 美国), TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株 (美国 Fox Chase Cancer Center 范萍教授赠予), 杜伯克改良伊波尔培养基 (DEME 培养基) (GIBCO, 美国), 胎牛血清 (GIBCO, 美国), 10 cm 培养皿 (Corning, 美国), 小鼠抗人 c-Src 单克隆抗体 (CST, 美国), 兔抗人 c-Src (Tyr416) 磷酸抗体 (CST, 美国), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 内参 (Abmart, 中国), 二抗 (Abmart, 中国), 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 细胞凋亡检测试剂盒 (Roche, 德国), 吖啶橙 (AO), 溴化乙啶 (EB) (Sigma, 美国) 及 c-Src 阻滞剂 PP2 (Sigma, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 实验组为 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 对照组为 TAM 治疗敏

感的人乳腺癌 MCF-7 细胞株, 分别放入 10 cm 的细胞培养皿中培养, 均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于细胞培养箱中培养 (37 °C, 95% O₂), 每隔 2 天换液 1 次, 待 80%~90% 的细胞融合后进行实验。

1.2.2 c-Src 的表达及其磷酸化水平的检测 细胞生长稳定后, 0.25% 胰酶消化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤离心 2 次, 沉淀加入细胞裂解液 1 mL 混匀, 超声粉碎、离心 (冰上粉碎 30 s, 离心 14 000 r/min, 10 min) 后, 保留上清液, 蛋白定量。将两组蛋白上样量调整一致, 加入 1 × 上样缓冲液进行蛋白变性 (98 °C, 5 min), 上样行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); 电泳结束后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜), 然后用含 5% 脱脂奶粉的溶解有吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 封闭; 一抗 (c-Src 抗体、c-Src 磷酸化抗体、GAPDH 内参) 孵育 (4 °C 静置过夜), PBST 漂洗膜 3 次 (10 min/次); 二抗孵育 (室温轻摇 1 h), PBST 漂洗膜 3 次 (10 min/次), 辣根过氧化物酶 HRP-ECL 发光法显影曝光。

1.2.3 细胞凋亡测定 两组细胞分别置于 12 孔板 (细胞密度为 8×10^4 /孔) 中培养 2 d 后, 加入 PP2 (5 μ mol/L) 处理 48 h 后胰酶消化收集细胞, 然后用 ELISA 法测定细胞凋亡 (具体按试剂盒操作步骤进行)。用抗组蛋白抗体包被酶标板, 加入含有核小体和寡聚核小体的细胞凋亡裂解物, 再加入过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体。显色后, 用酶标仪分析, 测定 405 nm 处的 OD₄₀₅ 值; 凋亡细胞越多, OD₄₀₅ 值越高。细胞凋亡用富集指数 (enrichment factor, EF) 表示。EF = (实验 OD 值 - 本底 OD 值) (诱导凋亡处理的细胞) / 阴性对照 OD 值 (未经诱导凋亡处理的细胞)。

1.2.4 细胞凋亡率测定 细胞培养、处理及收集

同上。调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液,加入 $4 \mu\text{L}$ AO/EB 染色液 ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ AO 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ EB),混匀。荧光显微镜下观察计数 200 个细胞,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率用凋亡细胞数占总细胞数的百分比表示。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组样本均数的比较采用 t 检验,由 SPSS17.0 统计软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 c-Src 的表达及其磷酸化水平

实验组的 c-Src 表达量和磷酸化水平均较对照组明显增高 (图 1)。

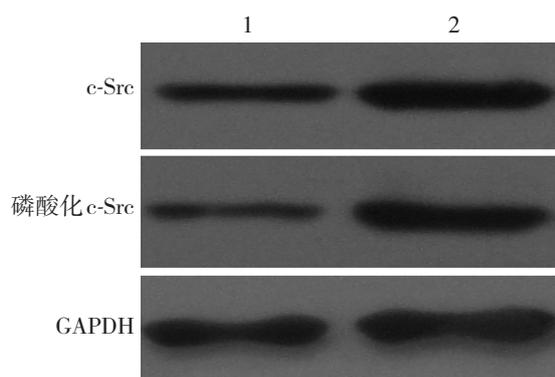


图 1 两组细胞 c-Src 的表达及其磷酸化水平 1: 对照组; 2: 实验组

Figure 1 The expression levels of c-Src and phosphorylated c-Src in two groups of cells 1: Control group; 2: Experimental group

2.2 PP2 处理后的细胞凋亡情况

c-Src 阻滞剂 PP2 处理两组细胞后,实验组的 EF 值及细胞凋亡率均较对照组明显增高 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 两组细胞 PP2 处理后的凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of apoptosis in the two groups of cells after PP2 treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	EF 值	细胞凋亡率 (%)
对照组	1.54 ± 0.30	13.7 ± 1.2
实验组	3.95 ± 0.52	35.8 ± 1.4
t	26.837	37.907
P	< 0.05	< 0.05

3 讨论

研究表明,雌激素受体^[2]、内皮生长因子受体^[1]及信号传导分子^[3-4]等的异常变化与乳腺癌内分泌治疗耐药密切相关。对于 ER- α 阳性的乳腺癌患者,以 TAM 为主的内分泌治疗可以显著改善其 5 年生存率^[5],但长期应用后所产生的获得性耐药可导致肿瘤复发和死亡,限制了其临床应用。因此,乳腺癌内分泌治疗耐药的机制及耐药的逆转一直被视为研究热点。

c-Src 作为一种非受体酪氨酸激酶,在多种肿瘤中表达,包括胰腺癌、结肠癌及乳腺癌^[6-7]。研究^[8]表明,Src 激酶的活化在胰腺肿瘤形成中是一个早期事件,与胰腺癌的不良预后有关,且 Src 是 Src 家族激酶中主要的活性蛋白。此外,Src 活性的增强与胰腺癌对吉西他滨治疗的耐药有关,Src 抑制剂的应用可克服这种耐药性^[9]。作为治疗转移性结肠癌的主要药物伊立替康 (irinotecan) 同样也因原发性耐药和获得性耐药而限制了其在临床上的广泛应用,而获得性耐药的产生伴随着表皮生长因子受体 1 (EGFR), Her-2, Her-3 和 Src 蛋白的过度表达及 Src 活化^[10]。Sánchez-Bailón 等^[11]研究显示, c-Src 的活化可促进人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、生存和转移,阻断 c-Src 的活性可抑制乳腺癌细胞的迁移和侵犯。Karim 等^[12]研究表明,应用达沙替尼 (dasatinib) 阻断 Src 的活性可抑制乳腺癌的进展。在人 MCF-7 乳腺癌细胞中, c-Src 可调控细胞周期进展,应用 PP2 或基因沉默阻断 c-Src 可下调细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 和细胞周期蛋白 E (cyclin E) 的表达^[13]。Zhang 等^[1]研究表明, c-Src 的活化导致曲妥单抗治疗 HER2 阳性乳腺癌的获得性和原发性耐药,阻断 c-Src 同时应用曲妥单抗将恢复其治疗乳腺癌的敏感性。由此可见, c-Src 与肿瘤的进展及多种治疗耐药密切相关。

本研究检测了 c-Src 在 TAM 治疗敏感及耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达情况,结果显示实验组 c-Src 的表达明显高于对照组,磷酸化 c-Src 水平亦较对照组明显增高。提示 c-Src 在内分泌治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中处于高表达及高活性状态,耐药细胞已依赖 c-Src 生长。同时也说明 c-Src 的过度活化可能是 ER- α 阳性的乳腺癌内分泌治疗耐药的重要机制之一。研究

表明 Src 抑制剂与内分泌治疗相结合, 可以明显推迟乳腺癌耐药性的产生^[14-18]。提示 c-Src 可能在乳腺癌内分泌治疗耐药中发挥重要作用。本研究结果与之一致。

既然耐药细胞已依赖 c-Src 生长, 那么其对于 c-Src 抑制剂的治疗可能更为敏感。本研究通过应用 c-Src 抑制剂 PP2 处理乳腺癌细胞, 结果发现实验组内分泌治疗耐药细胞的富集指数较对照组内分泌治疗敏感细胞明显增高 ($P < 0.05$); 提示实验组细胞凋亡较对照组增多, 细胞凋亡率也明显增高 ($P < 0.05$)。本研究达到了预期结果。

综上所述, c-Src 在 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞中处于高表达及高活性状态, 这种耐药细胞已依赖 c-Src 生长, 并对 c-Src 抑制剂的治疗更敏感。此结果为临床上内分泌治疗耐药的乳腺癌患者提供了一个新思路。本课题组下一步将进行 c-Src 相关通路及内分泌治疗耐药逆转研究, 以期进一步阐明乳腺癌内分泌治疗耐药的可能机制。

参考文献

- [1] Zhang S, Huang WC, Li P, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways[J]. *Nat Med*, 2011, 17(4):461-469.
- [2] Thrane S, Lykkesfeldt AE, Larsen MS, et al. Estrogen receptor α is the major driving factor for growth in tamoxifen-resistant breast cancer and supported by HER/ERK signaling[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. [Epub ahead of print]
- [3] 王秀玲, 益莉娜, 丁佩芬, 等. 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 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(12):1197-1199.
- [4] Al Saleh S, Sharaf LH, Luqmani YA. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(5):1197-1217.
- [5] Jordan VC. A century of deciphering the control mechanisms of sex steroid action in breast and prostate cancer: the origins of targeted therapy and chemoprevention[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4):1243-1254.
- [6] Morton JP, Karim SA, Graham K, et al. Dasatinib inhibits the development of metastases in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(1):292-303.
- [7] Lopez J, Hesling C, Prudent J, et al. Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(9):1459-1469.
- [8] Shields DJ, Murphy EA, Desgrosellier JS, et al. Oncogenic Ras/ Src cooperativity in pancreatic neoplasia[J]. *Oncogene*, 2011, 30(18):2123-2134.
- [9] Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, et al. Inhibition of SRC tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(7):2307-2318.
- [10] Petitprez A, Larsen AK. Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(5):958-964.
- [11] Sánchez-Bailón MP, Calcabrini A, Gómez-Domínguez D, et al. Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(6):1276-1286.
- [12] Karim S, Creedon H, Patel H, et al. Dasatinib inhibits mammary tumour development in a genetically engineered mouse model[J]. *J Pathol*, 2013, doi: 10.1002/path.4202. [Epub ahead of print]
- [13] Liu X, Du L, Feng R. c-Src regulates cell cycle proteins expression through protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 beta and extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathways in MCF-7 cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013. [Epub ahead of print]
- [14] Chen Y, Guggisberg N, Jorda M, et al. Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10):3396-3405.
- [15] Hiscox S, Jordan NJ, Smith C, et al. Dual targeting of Src and ER prevents acquired antihormone resistance in breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 115(1):57-67.
- [16] Hiscox S, Barrett-Lee P, Borley AC, et al. Combining Src inhibitors and aromatase inhibitors: a novel strategy for overcoming endocrine resistance and bone loss[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(12):2187-2195.
- [17] Chen Y, Alvarez EA, Azzam D, et al. Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(1):69-78.
- [18] Vallabhaneni S, Nair BC, Cortez V, et al. Significance of ER-Src axis in hormonal therapy resistance[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(2):377-385.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 胡浩, 顾元龙, 朱从元, 等. c-Src 在 TAM 治疗耐药的人乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(5):629-632. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.020

Cite this article as: HU H, GU YL, ZHU CY, et al. Expression and significance of c-Src in human breast cancer MCF-7 cells resistant to tamoxifen therapy[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(5):629-632. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.020