

PI3K/AKT 通路参与调控乳腺癌多药耐药和侵袭转移的研究

郭崇勇¹ 柯卫锋¹ 宋科瑛¹ 王建丰¹ 周凌² 李克^{1△}

(1 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海 200080 2 上海市第一人民医院分院普外科 上海 200081)

摘要 目的:探讨磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase,PI3K/AKT)信号通路与乳腺癌多药耐药和侵袭转移的相关性。方法:以乳腺癌细胞系 MCF-7 为母本,持续低浓度加药诱导建立阿霉素(Adriamycin,ADR)耐药系 MCF-7/ADR'。细胞免疫荧光检测两细胞系中磷酸化 AKT(phosphorylated AKT, P-AKT)、P-糖蛋白(P-Glycoprotein, P-gp)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达。PI3K 抑制剂 LY294002 作用两系前后,Western Blot 检测 P-AKT、MMP-2、P-gp 的表达改变及 qRT-PCR 检测 MMP-2、MDR1 的表达改变。结果:P-AKT、P-gp(MDR1)、MMP-2 在 MCF-7 中为低表达或不表达,MCF-7/ADR' 中为高表达。LY294002 作用两系后,P-AKT、P-gp(MDR1)、MMP-2 在 MCF-7/ADR' 中的表达明显减低($P<0.05$),MCF-7 无明显改变。结论:抑制 PI3K/AKT 信号通路可有效降低 MCF-7/ADR' 耐药和侵袭转移能力,PI3K/AKT 通路是调控乳腺癌多药耐药和侵袭转移的重要信号通路之一。

关键词 乳腺癌 耐药性 转移 PI3K/AKT

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)25-4809-04

PI3K/AKT Signalling Pathway Involves in the Modulation of Multidrug Resistance and Metastasis in Breast Cancer

GUO Chong-yong¹, KE Wei-feng¹, SONG Ke-ying¹, WANG Jian-feng¹, ZHOU Ling², LI Ke^{1△}

(1 Department of General Surgery, First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China;

2 Department of General Surgery, Branch Hospital of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200081, China)

ABSTRACT **Objective:** To study the relationship between phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase (PI3K/AKT) signalling pathway and the resistance or invasive ability of breast cancer. **Methods:** MCF-7/ADR' were established by culturing parental MCF-7 cells with increasing concentration of adriamycin. The expression of phosphorylated AKT (P-AKT), P-Glycoprotein (P-gp) and matrix metalloproteinase-2(MMP-2) was investigated by Immunofluorescence assay. The expression of P-AKT, P-gp and MMP-2 with or without treatment of the PI3K inhibitor LY294002 was investigated by Western blot assay. Real-time quantitative PCR assay was used to investigate the expression of MDR1 and MMP-2. **Results:** In MCF-7 cells, P-AKT, P-gp (MDR1) and MMP-2 were neither detected nor only weakly expressed. In MCF-7/ADR' cells, the expression of P-AKT, P-gp (MDR1) and MMP-2 was increased. Treatment of MCF-7/ADR' cells with LY294002 can seriously reduced the expression of P-AKT, P-gp (MDR1) and MMP-2. Significant differences were not observed in MCF-7 cells. **Conclusion:** The resistance and metastasis can be reduced significantly through suppression of the PI3K/AKT signalling pathway. PI3K/AKT kinase pathway may be important in the modulation of resistance and metastasis in breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; Resistance; Metastasis; PI3K/ AKT

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)25-4809-04

前言

近年来,乳腺癌的发病率逐年上升,手术、化疗等传统治疗的结果往往不尽如人意。究其原因,肿瘤的多药耐药与复发转移是导致患者预后不良的重要原因之一。既往对乳腺癌的多药耐药和复发转移的研究多为独立进行,近年来备受国内外学者关注。本实验室先期临床研究发现乳腺癌的耐药和转移之间存在一定的相关性^[1],众多研究表明 PI3K/AKT 通路与肿瘤

的耐药和转移密切相关^[2]。本实验拟从体外检测 PI3K/AKT 通路是否同时参与调控乳腺癌多药耐药和侵袭转移。

1 材料与方法

1.1 材料

阿霉素购自深圳万乐药业公司,鼠抗人 P-gp 抗体购自 Santa-Cruz 公司,LY294002、鼠抗人 P-AKT 及 MMP-2 抗体购自 Cell Signaling 公司,羊抗鼠 Cy3 荧光二抗购自 DAKO 公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAPI 购自碧云天公司,Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自上海闪晶公司,胎牛血清、高糖 DMEM 购自 Gibco 公司。

1.2 细胞系及细胞培养

作者简介 郭崇勇(1985-)男,硕士,主要研究方向:乳腺癌多药耐药和侵袭转移相关机制的研究,E-mail:qygcy1985@163.com

△通讯作者 李克,E-mail:like1955@gmail.com

(收稿日期:2012-03-07 接受日期:2012-04-02)

既往学术界 MCF-7/ADR 细胞株的真正起源备受争议^[3-5], 本课题组以乳腺癌细胞系 MCF-7 (购自上海生科院, 源自 ATCC) 为母本, 持续低浓度加药诱导, 建立 MCF-7/ADR' (耐药浓度为 5×10^{-6} mol/L)^[6], 所有实验前 MCF-7/ADR' 脱药处理 14 天。LY294002 作用浓度为 5 mol/L, 作用时间为 2 小时。

1.3 细胞免疫荧光

取对数生长期的 MCF-7 及 MCF-7/ADR' 常规消化制做细胞爬片, 取出长满细胞的玻片 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 0.5% Triton 穿孔, 1% BSA 封闭, 加入一抗孵育细胞过夜, PBS 漂洗, 加 Cy3 标记的二抗 IgG 孵育, PBS 漂洗, DAPI 染色液封片, 荧光显微镜镜检拍照。

1.4 Western Blot

取未处理和 LY294002 处理的 MCF-7 及 MCF-7/ADR', RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒蛋白定量, 取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶室温封闭, 分别加入相应一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 漂洗, 加入相应二抗, 37 $^{\circ}$ C 1 小时, TBST 漂洗三次加 ECL 发光剂后显影。

1.5 qRT-PCR

取未处理和 LY294002 处理的 MCF-7、MCF-7/ADR', 加入 600 μ L TRIZOL 提取 RNA, 逆转录合成 cDNA。引物设计如下, MDR1 上游引物 5'-GCTCATCGTTTGTCTACAGTTCG-3';

下游引物 5'-ATTTCGAAGGCATCAATTCAC-3';

MMP-2 上游引物 5'-GGCCTCTCCTGACATTGAC-CTT-3';

下游引物 5'-GGCCTCGTATACCGCATCAATC-3';

内参 β -actin: 上游引物 5'-TGACGTGGACATCCG-CAAAG-3';

下游引物 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。循环条件如下: 94 $^{\circ}$ C 4 分钟, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 20 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 共 35 个循环。

1.6 统计学方法

所有结果数据采用 SAS9.0 统计软件包进行统计分析处理。配对资料的比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫荧光检测 P-AKT、P-gp、MMP-2 在细胞中的表达

P-AKT 为 AKT 的活化形式, 主要分布于肿瘤细胞细胞质内。P-gp、MMP-2 均为跨膜糖蛋白, 主要分布于肿瘤细胞的细胞膜上。在亲本 MCF-7 中, 三者的表达为弱表达或不表达。阿霉素耐药系 MCF-7/ADR' 中, P-gp 表达明显增加, 同时伴有 P-AKT 和 MMP-2 的表达增加(见图 1)。

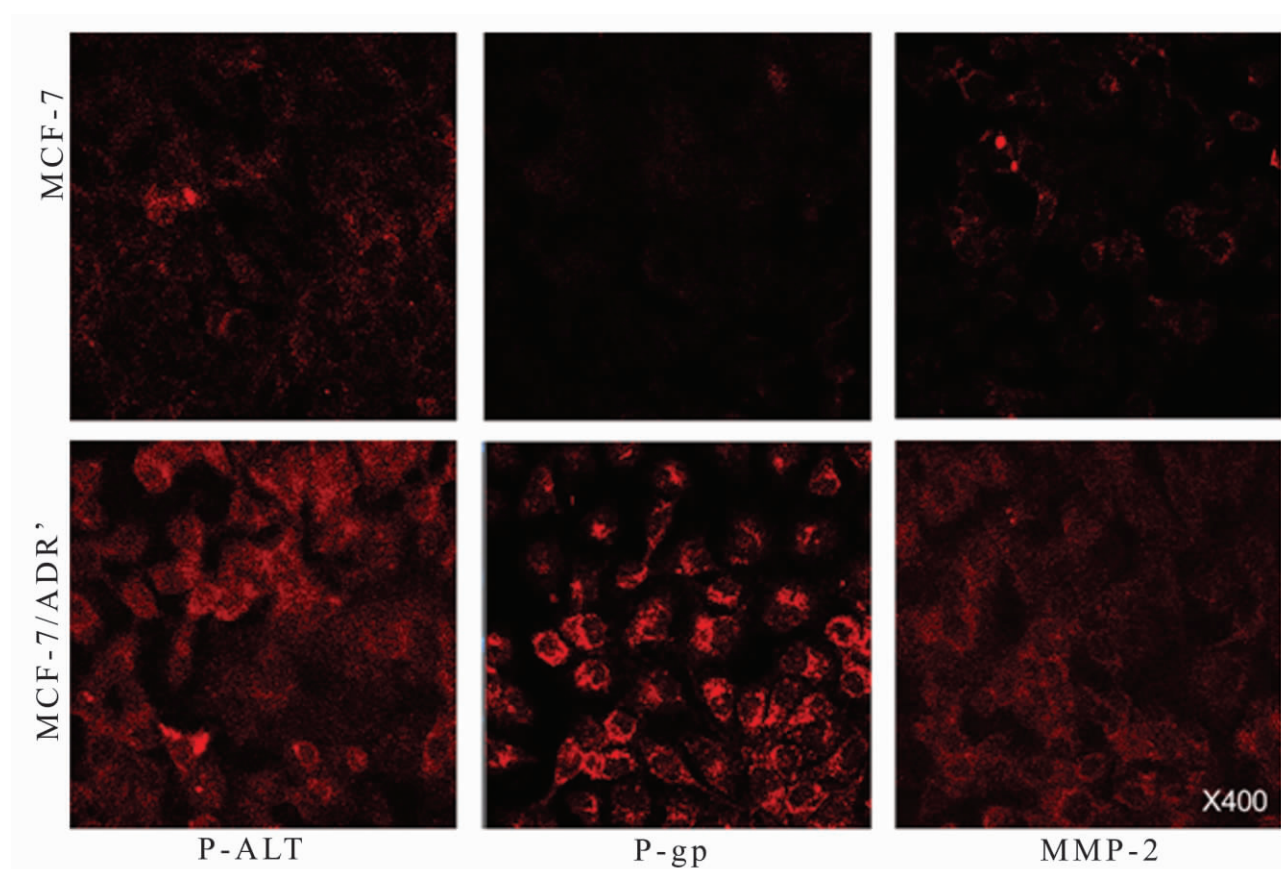


图 1 细胞免疫荧光检测 P-AKT、P-gp 和 MMP-2 在 MCF-7、MCF-7/ADR' 中的表达($\times 400$)

Fig.1 Expression of P-AKT, P-gp and MMP-2 in MCF-7 cells and MCF-7/ADR' cells was examined by immunofluorescence assay($\times 400$)

2.2 Western Blot 检测 PI3K 抑制剂 LY294002 作用 MCF-7 及 MCF-7/ADR' 前后的 P-AKT、MMP-2、P-gp 蛋白水平表达的改变

LY294002 是 PI3K/AKT 通路的抑制剂, 可有效阻断 PI3K/AKT 信号通路, 并产生相应的效应。与细胞免疫荧光结果相似, 在 MCF-7 中, P-AKT、MMP-2 和 P-gp 为低表达或不表

达,表现为条带低密度或淡染。MCF-7/ADR' 中,三者为高表达,表现为条带密度增加。LY294002 作用前后,三者 MCF-7 中表达未见明显改变,而 MCF-7/ADR' 中表现为明显降低,表现为条带密度明显减弱(见图 2)。

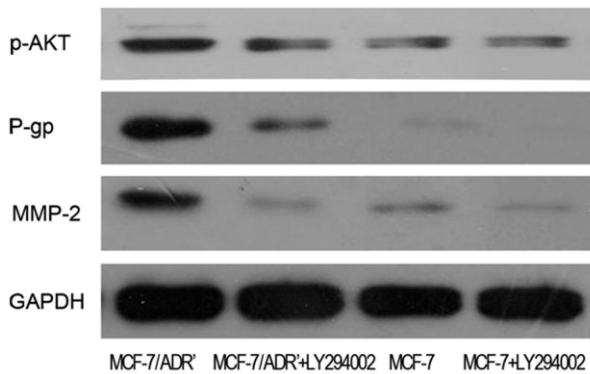


图 2 Western Blot 检测 MCF-7、MCF-7/ADR' 中 P-AKT、P-gp 及 MMP-2 的表达

Fig.2 Expression of P-AKT, P-gp and MMP-2 in MCF-7 cells and MCF-7/ADR' cells was examined by Western Blot assay

2.3 qRT-PCR 检测 PI3K 抑制剂 LY294002 作用 MCF-7 及 MCF-7/ADR' 前后 MMP-2、MDR1 mRNA 水平表达的改变

qRT-PCR 检测 MMP-2、MDR1 mRNA 水平改变。MDR1 是编码肿瘤细胞 P-gp 的基因。以 MCF-7 作为参照, MCF-7/ADR' 中 MDR1 及 MMP-2 的表达明显升高($P < 0.05$, 图 3A)。

LY294002 作用后, MCF-7 中 MDR1 及 MMP-2 mRNA 的表达无明显改变 ($P > 0.05$, 图 3B)。LY294002 作用后, MCF-7/ADR' 中, MDR1、MMP-2 mRNA 的表达下调($P < 0.05$, 图 3C)。

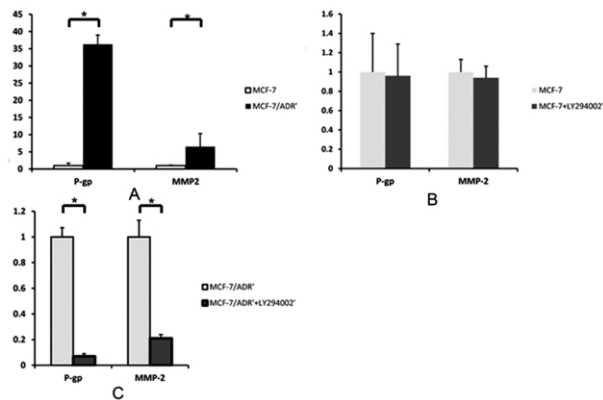


图 3 qRT-PCR 检测 MDR1、MMP-2 的表达情况 (* $P < 0.05$) (A) MCF-7 作为参照, MCF-7 和 MCF-7/ADR' 中 MDR1、MMP-2 的表达情况 (B) LY294002 作用 MCF-7 前作为参照, LY294002 作用前后 MCF-7 中 MDR1、MMP-2 的表达情况 (C) LY294002 作用 MCF-7/ADR' 前作为参照, LY294002 作用前后 MCF-7/ADR' 中 MDR1、MMP-2 的表达情况

Fig. 3 Expression of MDR1, MMP-2 was examined by qRT-PCR assay (A) MCF-7 cells was the control group, the expression of MDR1, MMP-2 was examined in MCF-7 cells and MCF-7/ADR' cells. (B) MCF-7 cells which were not treated with LY294002 were the control group, effect of treatment with or without LY294002 on levels of MMP-2 and MDR1 kinase was detected in MCF-7 cells (C) MCF-7/ADR' cells which were not treated with LY294002 were the control group, effect of treatment with or without LY294002 on levels of MMP-2 and MDR1 was detected in MCF-7/ADR' cells

3 讨论

肿瘤的多药耐药与侵袭转移一直以来都是肿瘤治疗难以攻克的难题之一,近年来两者之间的联系已备受国内外学者的关注。本实验室先前临床研究发现乳腺癌的耐药和转移之间存在一定相关性^[1,7] PI3K/AKT 信号通路与乳腺癌侵袭转移具有密切关系^[8] 且 MMP-2 及 P-gp 的表达具有明显相关性^[9]。那么, PI3K/AKT 通路是否同时参与调控乳腺癌的多药耐药和侵袭转移有待进一步证实。

P-gp 介导的多药耐药(multidrug resistance,MDR)是肿瘤化疗耐药和病人预后不良的主要原因之一^[10-12]。近年来部分研究发现, P-gp 的高表达除了与多药耐药相关外还与肿瘤的侵袭转移密切相关^[2]。在我们建立 MCF-7/ADR' 的过程中,随着耐药浓度的逐渐升高, P-gp 的表达增加,同时伴有 MMP-2 的表达增加,与我们先前的临床研究结果相符^[9]。同时 Bjornland 等^[13] 在肝癌的体外研究中发现了类似现象。

肿瘤的侵袭转移主要与胞外基质的降解、细胞粘附因子的连接等密切相关。MMP-2 是降解 IV 胶原酶的主要酶类之一, IV 型胶原酶的降解意味着肿瘤细胞浸润即将或已发生。PI3K/AKT 信号通路与细胞的生长、增殖、凋亡等密切相关,同时众多研究表明其与肿瘤的多药耐药和侵袭转移有着密切关系^[2]。Barancik 等^[14]在白血病的研究中发现, LY294002 抑制 PI3K/AKT 通路可有效逆转 P-gp 介导的细胞对长春新碱的抵抗。AKT 是细胞生存通路 PI3K/AKT 的关键分子,其被磷酸化形成 P-AKT 后才具有活性^[14]。本实验结果显示,与 MCF-7 相比, MCF-7/ADR' 中 P-AKT、P-gp 呈现高表达状态, LY294002 抑制 PI3K/AKT 通路后, MCF-7/ADR' 中两者表达同时降低。多位学者分别在乳腺癌^[15]、胃癌^[16]、白血病^[14]的研究中也得到了相同结果。Tian 等^[17]发现 PI3K/AKT 通路与 MMP-2 表达密切相关。本实验中, MCF-7/ADR' 高表达 P-AKT、MMP-2, 抑制 PI3K/AKT 后,两者均表达下调,而 MCF-7 未见明显变化。同时,众多学者也在乳腺癌^[18]、肝癌^[17]、甲状腺癌^[19]等的研究中得到了类似结果。在多种肿瘤组织及细胞中 PI3K/AKT 信号通路参与调控 P-gp 及 MMP-2 的表达,从而调控肿瘤的多药耐药和侵袭转移。本实验中,我们发现在阿霉素耐药株 MCF-7/ADR' 中, P-AKT、MMP-2 及 P-gp 的表达明显增高,通路被抑制后,细胞 P-gp 和 MMP-2 的表达均下调。我们推测可能是阿霉素通过某种机制激活肿瘤细胞 PI3K/AKT 通路,导致耐药指标 P-gp 和侵袭转移指标 MMP-2 的表达增加。PI3K/AKT 信号通路可能是通过调控 P-gp 及 MMP-2 的表达从而调节肿瘤的多药耐药和侵袭转移。在肿瘤的临床治疗中,联合应用能靶向抑制 PI3K/AKT 通路的药物可能会有效提高化疗效果和病人的预后。

Yang 等^[20]发现 P-gp 作用底物与 P-gp 作用后,能激活 PI3K/AKT 信号通路,同时伴胞膜边缘波动增加和细胞侵袭转移能力增强。P-gp 与 PI3K/AKT 之间是否存在正反馈通路有待进一步证实。同时,有学者研究发现 P-gp 的抑制剂 PSC833 作用于耐药株后可明显减低其侵袭能力^[13]。在我们的前期临床研究发现 P-gp、MMP-2 的表达具有一定相关性^[9]。且在建立耐药细胞株 MCF-7/ADR' 过程中,随着耐药浓度的逐渐增加,

P-gp、MMP-2 的表达也逐渐增加,两者之间是否存在其他的联系或存在一定的信号通路彼此间进行调节需进一步的实验来证实。

参考文献(References)

- [1] 卢烈盛, 宋科瑛, 王瑞涛, 等. 乳腺癌原发灶和淋巴结转移灶 MDR1 mRNA 表达及与临床指标的相关性分析 [J]. 肿瘤, 2009, 29 (3):276-279
Lu Lie-sheng, Song Ke-ying, Wang Rui-tao, et al. Analysis on the correlation of MDR1-1 mRNA expression in primary breast cancer and its lymph node metastatic lesions with clinical parameters[J]. Tu-mor, 2009, 29:276-279(In Chinese)
- [2] 柯卫锋, 宋科瑛, 李克. P-糖蛋白与 CD44 在肿瘤中表达的相关性 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2009, 35(7):489-493
Ke Wei-feng, Song Ke-ying, Li Ke. Correlation between P-glycoprotein and CD44 in cancer[J]. J Int Oncol, 2009, 35:489-493(In Chinese)
- [3] Pirmia F, Breuleux M, Schneider E, et al. Uncertain identity of doxorubicin-resistant MCF-7 cell lines expressing mutated p53 [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(18):1535-1536
- [4] Mehta K, Devarajan E, Chen J, et al. Multidrug-resistant MCF-7 cells: an identity crisis?[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(21):1652-1654
- [5] Liscovitch M, Ravid D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/Adr cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2007, 245(1-2):350-352
- [6] Ke W, Yu P, Wang J, et al. MCF-7/ADR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are not derived from MCF-7 breast cancer cells: a loss for breast cancer multidrug-resistant research [J]. Med Oncol, 2011, 28suppl1:S135-141
- [7] 王晔, 宋科瑛, 王建丰, 等. 乳腺浸润性导管癌中 P-gp 和 C-erbB-2 的表达及临床意义[J]. 中国临床医学, 2008, 15(5):725-727
Wang Ye, Song Ke-ying, Wang Jian-feng, et al. Expression and clinical significance of P-gp and C-erbB-2 in infiltrating ductal breast cancer and metastatic axillary lymph nodes [J]. Clinical medical journal of china, 2008, 15:725-727(In Chinese)
- [8] Yu P, Zhou L, Ke W, et al. Clinical significance of pAKT and CD44v6 overexpression with breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(8):1283-1292
- [9] 王晔, 王建丰, 仇生龙, 等. P-gp、MMP-2、C-erbB-2 在乳腺癌原发灶和转移淋巴结中的表达对比研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11 (1):94-97
Wang Ye, Wang Jian-feng, Qiu Sheng-long, et al. Expression and clinical significance of P-gp, MMP-2 and c-erbB-2 in infiltrating ductal breast cancer and metastatic axillary lymph nodes [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11:94-97(In Chinese)
- [10] Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna Z, et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism[J]. Oncogene, 2003, 22(47):7468-7485
- [11] Sauna Z E, Kim I W, Ambudkar S V. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1)[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(5-6): 481-487
- [12] Tsuruo T, Naito M, Tomida A, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal [J]. Cancer Sci, 2003, 94(1):15-21
- [13] Bjornland K, Lehne G, Johansen H T, et al. Human hepatoma cells rich in P-glycoprotein display enhanced in vitro invasive properties compared to P-glycoprotein-poor hepatoma cells[J]. Oncol Res, 1998, 10(5):255-262
- [14] Barancik M, Bohacova V, Sedlak J, et al. LY294002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 29(5):426-434
- [15] Liu F, Liu S, He S, et al. Survivin transcription is associated with P-glycoprotein/MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2010, 23(5):1469-1475
- [16] Zhang Y, Qu X, Hu X, et al. Reversal of P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in human gastric adenocarcinoma cells[J]. J Pathol, 2009, 218(2):248-255
- [17] Tian T, Nan K J, Guo H, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6):1593-1600
- [18] Morozevich G E, Kozlova N I, Cheglakov I B, et al. Implication of alpha5beta1 integrin in invasion of drug-resistant MCF-7/ADR breast carcinoma cells: a role for MMP-2 collagenase [J]. Biochemistry (Mosc), 2008, 73(7):791-796
- [19] Urso L, Muscella A, Calabriso N, et al. Effects of cisplatin on matrix metalloproteinase-2 in transformed thyroid cells[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(6):810-816
- [20] Yang J M, Vassil A, Hait W N. Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase in membrane ruffling induced by P-glycoprotein substrates in multidrug-resistant carcinoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(5):959-966