

依西美坦对乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响

潘沛锦^{1,2,3}, 彭健愉^{1,2,3}, 张晓慧^{1,2,3}, 王倩^{1,2,3}, 操龙斌^{1,2}, 蔚帅帅^{1,2}, 周克元^{2,3}, 李继霞^{2,3}, 曾今诚^{1,2}, 林碧华³ (1. 广东医科大学广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 广东省教育厅医学生物活性分子研究重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医科大学医学检验学院, 广东东莞 523808)

摘要: 目的 探讨依西美坦(Exemestane, EXE)对乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响。方法 CCK-8法和平板克隆形成实验检测细胞增殖; Hoechst 33258荧光染色和流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot检测凋亡相关蛋白(p27、Mcl-1、Bcl-2和Caspase-3)表达。结果 40 $\mu\text{mol/L}$ EXE显著抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖, 抑制率为36.7%; 20 $\mu\text{mol/L}$ EXE显著促进乳腺癌MCF-7细胞凋亡, 凋亡率为33.5%; 20 $\mu\text{mol/L}$ EXE有效促进乳腺癌MCF-7细胞p27表达并抑制Mcl-1、Bcl-2和Caspase-3的表达。结论 EXE可有效地诱导乳腺癌MCF-7细胞发生细胞凋亡。

关键词: 乳腺癌; 细胞凋亡; 依西美坦; 细胞增殖

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)05-0478-04

Effect of exemestane on the apoptosis of human breast neoplasms MCF-7 cells

PAN Pei-jin^{1,2,3}, PENG Jian-yu^{1,2,3}, ZHANG Xiao-hui^{1,2,3}, WANG-Qian^{1,2,3}, CAO Long-bin^{1,2}, YU Shuai-shuai^{1,2}, ZHOU Ke-yuan^{2,3}, LI Ji-xia^{2,3}, ZENG Jin-cheng^{1,2}, LIN Bi-hua³ (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics; 2. Key Laboratory of Medical Bioactive Molecular Research of Department of Education of Guangdong Province; 3. School of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of exemestane (EXE) on the apoptosis of human breast neoplasms MCF-7 cells. Methods Proliferative rate of MCF-7 cells was detected by CCK-8 assay and colony forming assay; Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) and Hoechst 33258 staining. The expression of the proteins related to apoptosis (p27, Mcl-1, Bcl-2 and Caspase-3) was detected by Western blot. Results 40 $\mu\text{mol/L}$ EXE significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells, and the inhibition ration was 36.7%; 20 $\mu\text{mol/L}$ EXE significantly promoted the apoptosis of MCF-7 cells, and the apoptosis rate was 33.5%; 20 $\mu\text{mol/L}$ EXE effectively promoted p27 expression and inhibited Mcl-1, Bcl-2 and Caspase-3 expression of MCF-7 cells. Conclusion EXE can effectively induce the apoptosis of human breast neoplasms MCF-7 cells.

Key words: breast neoplasms; apoptosis; exemestane; cell proliferation

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 约占女性所有肿瘤的18%^[1]。近年来, 乳腺癌发病率呈上升趋势, 发病趋向年轻化, 其死亡率在所有恶性肿瘤中排名第2^[2]。目前, 乳腺癌主要治疗手段包括手术治疗、放射治疗和药物治疗。依西美坦(Exemestane, EXE)是甾体类芳香化酶抑制剂, 属雄烯二酮类似物, 含有雄烯二酮母环结构, 也称芳香化酶灭

活剂。目前多数研究发现EXE可抑制多种肿瘤(如非小细胞癌、子宫肌瘤、肾上腺皮质瘤等)的发生发展, 但其机制均未完全阐述。本研究拟探讨EXE对乳腺癌MCF-7细胞凋亡的影响并阐述其可能的作用机制。

1 材料和方法

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No.81500007), 广东省医学科研基金项目(No.A2015206), 地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201610571027), 广东医科大学大学生创新实验项目(No.2015ZZDC001, LZDC005)。

收稿日期: 2017-08-10; **修订日期:** 2017-09-29

作者简介: 潘沛锦(1995-), 男, 本科在读。

通信作者: 林碧华, 女, 硕士, 高级实验师, E-mail: linbihua@gdmu.edu.cn。

1.1 试剂和仪器

依西美坦(EXE)购自大连美仑生物公司; CCK-8试剂盒、Hoechst 33258荧光染色试剂盒、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物公司; DMEM培养基、胎牛血清和0.25% EDTA-Trypsin购自Gibco公司; P27、Mcl-1、Bcl-2、Capase-3、GAPDH抗体购自Cell Signaling Technology, 人乳腺癌MCF-7细胞由本课题组保存所有; 其他试剂均为本课题组常规试剂。C400可见荧光成像系统购自美国Azure Biosystems, 多功能酶标仪购自BioTek公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8检测细胞增殖 收集对数期细胞, 以 1×10^3 个/孔接种于96孔板培养, 加入不同浓度(0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) EXE药物于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和适度培养箱培养24、48 h后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1.5 h后, 酶标仪检测每孔450 nm和630 nm波长下的吸光度值(A值)。具体方法参见CCK-8操作说明书进行。

1.2.2 平板克隆形成实验 收集对数期细胞, 以500个/皿接种在60 mm培养皿中, 静置培养0~8 d, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养; 弃去上清, PBS洗2次。纯甲醇或醋酸/甲醇(1:3)固定15 min, 去固定液, 加适量0.1% Giemsa染色液作用10~30 min, 弃染色液, 显微镜计数大于10个细胞的克隆数。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 Hoechst 33258荧光染色检测细胞凋亡 收集对数期细胞, 以 1×10^6 个/孔接种于12孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和适度培养箱培养, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的EXE, 继续培养24 h; 弃上清, 4%多聚甲醛4 $^{\circ}\text{C}$ 固定10~20 min, 弃固定液, PBS洗涤。Hoechst 33258染色液室温染色10 min, PBS洗涤, 封片剂封片后, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Annexin V-FITC法检测细胞凋亡 收集对数期细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中, 培养24 h后, 以1.0 g/L EXE分别处理24、48、72 h后, 收集细胞。按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书进行细胞凋亡检测。

1.2.5 Western Blot检测Mcl-1、Bcl-2和Caspase-3蛋白表达 收集对数期细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中, 细胞完全贴壁后, 加入不同浓度EXE, 继续培养48 h; 收集并裂解细胞, 12 000 r/min离心5 min后取上清液, 用BCA法测定蛋白含量。10% SDS-

PAGE将蛋白电转移至PVDF膜上, 5% 脱脂牛奶常温封闭2 h, 分别加入Mcl-1、Bcl-2和Caspase-3抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h, TBST漂洗后加入二抗室温孵育1 h, TBST漂洗。取适量的混合后的发光液体加在PVDF膜的蛋白面上, 置于C400成像系统中, 进行发光检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析及 q 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EXE抑制细胞增殖

随着EXE作用浓度及作用时间增加, EXE对MCF-7细胞增殖抑制率明显增加, 尤其是40 $\mu\text{mol/L}$ EXE作用MCF-7细胞48 h后, 细胞增殖抑制率达36.7%, 详见图1。另外, 平板克隆形成试验也显示随着EXE作用浓度增加, MCF-7细胞克隆形成能力受到明显抑制, 详见图2。

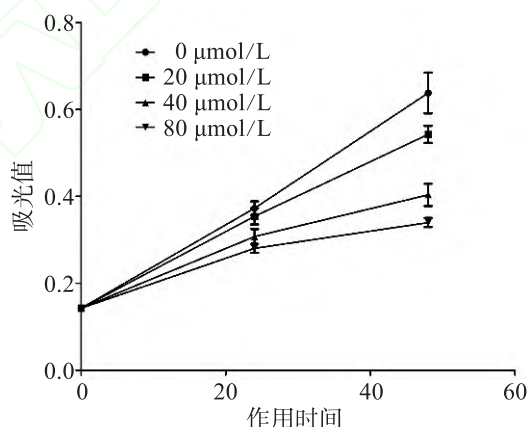


图1 EXE明显抑制乳腺癌细胞的增殖

2.2 EXE诱导细胞凋亡

随着EXE作用浓度增加, MCF-7细胞出现典型的凋亡形态学改变, 胞浆浓缩、核染色质聚集、核固缩等现象, 详见图3。流式细胞术检测细胞凋亡结果显示EXE能有效促进MCF-7细胞凋亡, 20 $\mu\text{mol/L}$ EXE显著促进乳腺癌MCF-7细胞凋亡, 凋亡率为33.5%, 详见图4。

2.3 EXE诱导凋亡相关蛋白表达

Western blotting检测不同EXE浓度作用MCF-7细胞48 h后, 细胞内p27、Mcl-1、Bcl-2、Capase-3蛋白表达随着EXE作用浓度增加, p27表达增加, Mcl-1、Bcl-2、Capase-3蛋白表达逐渐减弱, 见图5。

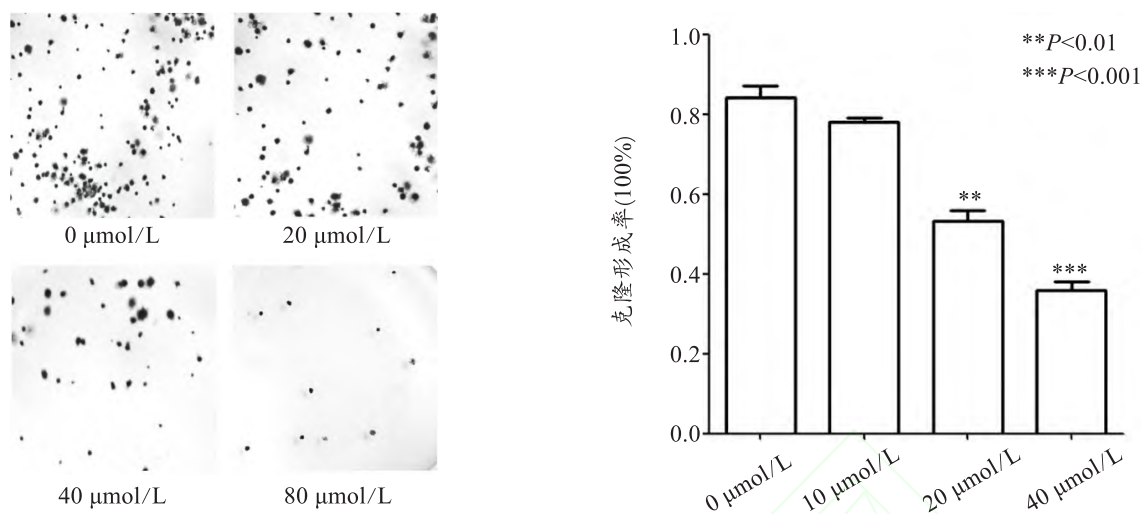


图2 平板克隆实验检测EXE对MCF-7体外抑制作用

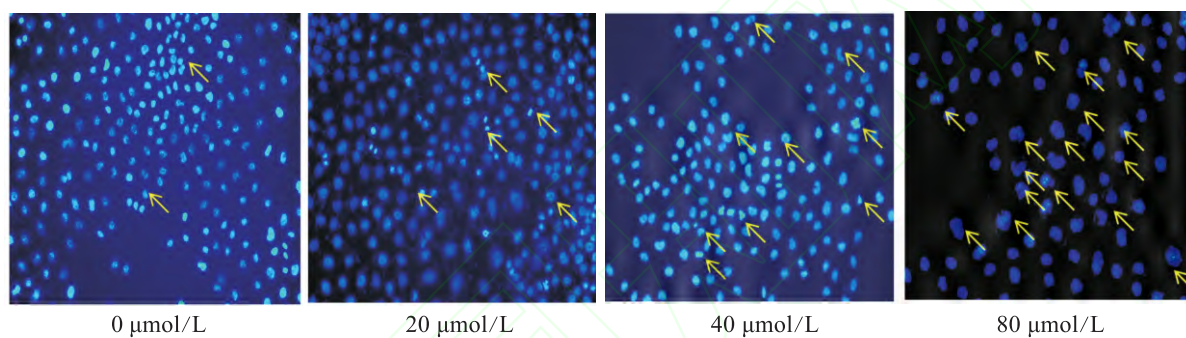


图3 EXE处理MCF-7细胞48 h后的形态学改变

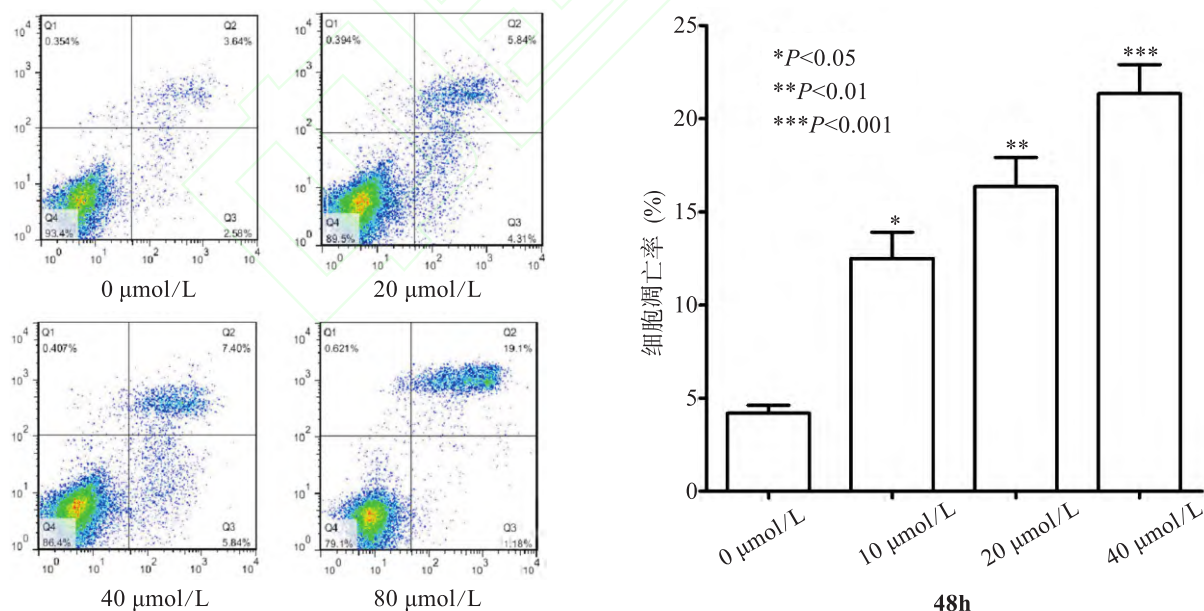


图4 流式细胞术检测MCF-7细胞凋亡

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,全球约有1/8的女性罹患乳腺癌^[2]。内分泌治疗是雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)阳性早期乳腺癌患者的重要

治疗手段^[3]。他莫昔芬(Tamoxifen, TAM)与芳香化酶抑制剂(Aromatase Inhibitor, AI)是目前乳腺癌临床治疗的常用药物^[4]。这两类药物都可以通过阻断雌激素信号传导通路或降低雌激素水平来抑制肿瘤细胞

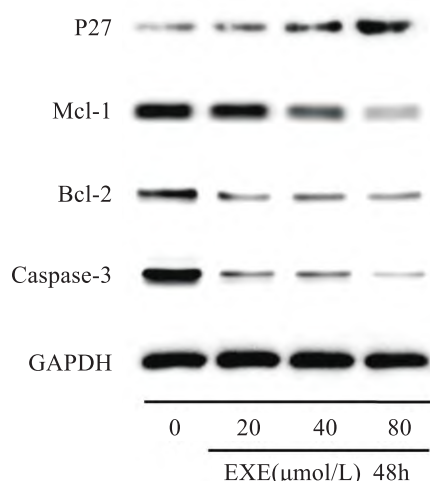


图5 EXE促进MCF-7凋亡的相关蛋白表达情况

的生长或活性, 达到治疗乳腺癌的目的。不同的是, 2016年乳腺癌NCCN 1版指南指出^[5], TAM主要适用于绝经前的治疗, AI则多适用于绝经后的治疗。Goss等^[6]的研究显示, 使用AI也可以显著降低34%绝经后ER⁺女性乳腺癌患者的复发风险。本研究的对象EXE属于甾体类不可逆AI, 可与芳香化酶活性基团永久结合导致其失活, 提高绝经后ER⁺高复发风险的患者的无病生存率, 不良反应低, 成为这部分患者的一线治疗药物^[7], 故探索EXE治疗乳腺癌的作用靶点显得尤为必要。

Macpherson等^[8]通过随访4 724名绝经后他莫昔芬辅助治疗2~3 a的妇女, 并将它们分成两组, 一组继续使用20~30 mg/d的他莫昔芬治疗, 另一组改用25 mg/d的依西美坦治疗, 直至完成5 a的疗程。结果发现两种药所起的疗效大致相同。而在乳腺癌的三期临床治疗中, 对371名绝经后激素依赖性乳腺癌患者选用依西美坦与他莫昔芬作为一线治疗药物, 2 a后EXE的痊愈率46%高于他莫昔芬的31%^[9]。Decensi等^[10]通过随机抽取高危绝经后4 560名三期治疗乳腺癌患者, 发现在使用35个月EXE后, 65%患者减少了乳腺癌的浸润。在雌激素受体阳性而HER2阴性的患者的二期或三期乳腺癌治疗中, 也可选择依维莫司(Everolimus)与EXE联合用药^[11]。

依西美坦的副作用是会引起心血管疾病、肌肉骨骼症状、骨密度降低以及新陈代谢改变^[9]。药物治疗不可避免的是其能使肿瘤细胞产生耐药性。临床上, 虽然临床医生鼓励最初从一线治疗中获益的患者使用二线或三线治疗, 但临床获益率已从一线TAM或AIs的70%降低到二线或其他线治疗的30%。

笔者通过EXE作用MCF-7细胞后, 细胞内p27表

达量增加, 考虑EXE为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 可阻断CAK诱导CDK4T hr172 和CDK2Thr160的磷酸化过程, 使CDK处于非活性状态, 对细胞周期实行负调控, 其最终的结果是抑制细胞分裂和增殖, 促进细胞分化和凋亡。同时, Mcl-1、Bcl-2、Caspase-3表达下调, 提示EXE促进细胞凋亡可能与Bcl-2、Mcl-1的下调, Bak的上调有关。然而, 本研究由于研究的靶蛋白较少, 其作用机制或信号通路尚未阐明, 有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 任军. 认识肿瘤干细胞对治疗转移性乳腺癌的重要性[J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(10): 721-723.
- [2] Trivedi M S, Crew K D. Implications of multigene testing for hereditary breast cancer in primary care[J]. World J Obstet Gynecol, 2016, 5(1): 50-57.
- [3] Zafrakas M, Papasozomenou P, Emmanouilides C. Sorafenib in breast cancer treatment: A systematic review and overview of clinical trials[J]. World J Clin Oncol, 2016, 7(4): 331-336.
- [4] 高亚琳, 杨逸雨, 李清若. 晚期乳腺癌内分泌治疗现状及展望[J]. 中华乳腺病杂志, 2016, 10(1): 54-56.
- [5] 叶松青, 张迪. 依西美坦联合卵巢抑制剂抑制那通治疗绝经前晚期乳腺癌患者的临床观察[J]. 海峡药学, 2016, 28(8): 106-108.
- [6] Goss P E, Ingle J N, Pritchard K I, et al. A randomized trial (MA.17R) of extending adjuvant letrozole for 5 years after completing an initial 5 years of aromatase inhibitor therapy alone or preceded by tamoxifen in postmenopausal women with early-stage breast cancer [C]. J Clin Oncol, 2016, 34: LBA1.
- [7] 王晓稼. 2016年美国ASCO年会乳腺癌内分泌治疗进展[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(8): 612-616.
- [8] Macpherson I R, Lindsay L, Canney P. Adjuvant treatment of breast cancer in postmenopausal women: role of exemestane[J]. Breast Cancer: Targets and Therapy, 2010, 2: 59-70.
- [9] Zucchini G, Geuna E, Milani A, Aversa C, et al. Clinical utility of exemestane in the treatment of breast cancer[J]. Int J Womens Health, 2015, 7: 551-563.
- [10] Decensi A, Dunn B K, Puntoni M, et al. Exemestane for breast cancer prevention: a critical shift[J]. Cancer Discov, 2012, 2(1): 25-40.
- [11] Hortobagyi G N. Everolimus plus exemestane for the treatment of advanced breast cancer: a review of subanalyses from BOLERO-2[J]. Neoplasia, 2015, 17(3): 279-288.