

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.008

· 基础研究 ·

Tautomycetin 诱导乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 的凋亡及其机制

牛铭山, 孙岩, 唐莉, 邱荣国(大连理工大学 化工与环境生命学部 分子药物中心, 辽宁 大连 116023)

[摘要] **目的:** 研究 tautomycetin 对乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 增殖及凋亡的影响及其机制。**方法:** MTT 法检测 tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 MCF-7/ADR 细胞的凋亡, Western blotting 法检测 tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞 caspase 相关蛋白、Bcl-2、Cyto-C、P53 蛋白表达和 Akt 磷酸化的影响。**结果:** Tautomycetin 可剂量(0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)依赖性地抑制 MCF-7/ADR 细胞的增殖($P < 0.05$), IC_{50} 值为(1.26 \pm 0.12) $\mu\text{mol/L}$; 与对照组相比, tautomycetin (1 $\mu\text{mol/L}$)可诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡, 早期凋亡比例由(0.67 \pm 0.18)% 升高至(17.2 \pm 3.8)%, 晚期凋亡比例由(0.96 \pm 0.23)% 升高至(28.4 \pm 5.7)%($P < 0.05$)。Tautomycetin 可活化 MCF-7/ADR 细胞中 caspase-7 和 caspase-9, 降低 Bcl-2 蛋白的表达, 促进线粒体释放 Cyto-C, 降低 p-Akt 的水平, 但对 caspase-8 和 P53 的表达没有影响。**结论:** Tautomycetin 可阻断 Akt 活化, 以 P53 非依赖的方式通过 Cyto-C 介导的通路诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡。

[关键词] 乳腺癌; tautomycetin; 增殖; 凋亡; caspase; 细胞色素 C

[中图分类号] R737.9; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0387-05

Tautomycetin induces apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7/ADR and its mechanism

NIU Ming-shan, SUN Yan, TANG Li, QIU Rong-guo (Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of tautomycetin on the proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7/ADR and the related mechanism. **Methods:** The effect of tautomycetin on the proliferation of MCF-7/ADR cells was examined by MTT assay; its effect on apoptosis of MCF-7/ADR cells was assessed by flow cytometry; and its effects on expressions of caspase-related proteins, Bcl-2, cytochrome C (Cyto-C), P53 and Akt in MCF-7/ADR cells were detected by Western blotting. **Results:** Tautomycetin inhibited the proliferation of MCF-7/ADR cells in a dose-dependent manner (0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), with the IC_{50} value of (1.26 \pm 0.12) $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control group, the early apoptosis rate of MCF-7/ADR cells after 1 $\mu\text{mol/L}$ tautomycetin treatment was increased from (0.67 \pm 0.18)% to (17.2 \pm 3.8)%, and the late apoptosis rate from (0.96 \pm 0.23)% to (28.4 \pm 5.7)%, ($P < 0.05$); tautomycetin activated caspase-9 and caspase-7, decreased Bcl-2 expression, promoted Cyto-C secretion and decreased p-Akt levels in MCF-7/ADR cells, while showed no obvious effect on caspase-8 and P53 expressions. **Conclusion:** Tautomycetin can inhibit the phosphorylation of Akt, and induce the Cyto-C-mediated apoptosis of MCF-7/ADR cells in a P53-independent pathway.

[Key words] breast cancer; tautomycetin; proliferation; apoptosis; caspase; cytochrome C

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 387-391]

[基金项目] 国家杰出青年科学基金资助项目(No. 30688003)。Project supported by the National Foundation for Distinguished Young Scientists of China (No. 30688003)

[作者简介] 牛铭山(1983 -), 男, 吉林省白山市人, 博士, 主要从事抗肿瘤药物分子作用机制的研究。E-mail: msnui24@hotmail.com

[通信作者] 邱荣国(QIU Rong-guo, corresponding author), E-mail: rqi2001@yahoo.com

乳腺癌是威胁女性健康最常见的恶性肿瘤之一,严重影响着患者的身心健康。肿瘤产生耐药性是影响恶性肿瘤化疗效果的重要因素,许多乳腺癌患者经历数次化疗后产生耐药,是其化疗失败、肿瘤复发转移的主要原因^[1-2]。Tautomycetin 是 1989 年从土壤微生物灰产色链霉菌的培养液中分离得到的具有抗真菌活性的化合物^[3],2006 年研究^[4]发现,tautomycetin 具有抗肿瘤活性。Tautomycetin 对乳腺癌等肿瘤具有非常好的抑制作用,本实验研究 tautomycetin 对乳腺癌阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADR 生长及凋亡的影响,阐明其诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡的机制,为进一步研究 tautomycetin 抗肿瘤作用的机制及其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

Tautomycetin 由本实验室从链霉菌 *Streptomyces griseochromogenes* 发酵液中分离提取。MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞购自湖南大学湘雅医学院。鼠抗人 Cyto-C 单克隆抗体,兔抗人 Pro-caspase-7、-8、-9 多克隆抗体,鼠抗人 P53 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。鼠抗人 Bcl-2、p-Akt 单克隆抗体购自北京中衫金桥生物技术有限公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究,BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司。PowerPac HC 电泳仪购自 Bio-Rad 公司,ST-II 电转化仪购自大连竞迈生物有限公司,流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司,Spectra max plus 酶标仪购自美国分子仪器公司。

1.2 乳腺癌细胞 MCF-7 和阿霉素耐药细胞 MCF-7/ADR 的培养

乳腺癌细胞 MCF-7 和阿霉素耐药细胞 MCF-7/ADR 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640,细胞均为贴壁细胞,用 0.25% 胰酶消化传代。

1.3 MTT 法检测 tautomycetin 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

将 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞以 3×10^4 /ml 的浓度接种于 96 孔平底板,5% CO₂、37 °C 孵育过夜。加入浓度为 0、0.01、0.1、1、10、100 μmol/L 的 tautomycetin,孵育 72 h。每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),孵育 4 h,小心吸去孔内培养液,每孔加入 200 μl 二甲基亚砷,振荡器上低速振荡 10 min,酶标仪检测各孔的光密度值(D_{490})。

1.4 流式细胞术检测 tautomycetin 对 MCF-7/ADR

细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡,将细胞培养液吸出,用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入适量胰酶消化液消化细胞。取 1×10^5 重悬的细胞,200 × g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。再加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。200 × g 离心 5 min,弃上清,加入 190 μl Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞。加入 10 μl 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测。

1.5 Western blotting 法检测 tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

将 MCF-7/ADR 细胞接种于 6 孔板平底板,待细胞贴壁后加入浓度为 0、0.5、1 μmol/L 的 tautomycetin 处理 12、24 h,加入细胞裂解液冰育 5 min,用细胞刮收集样品,冰浴 10 min,4 °C 10 000 × g 离心 10 min,吸出上清液,即为细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。以每孔 150 μg 的蛋白量上样,随后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,加入 5% 脱脂奶粉稀释的一抗(1:1 000),4 °C 过夜,然后膜用 PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化酶标记的 IgG 抗体(兔抗或鼠抗)的二抗(1:5 000),37 °C 孵育 2 h,再次漂洗后用 ECL 显色试剂盒进行显色,曝光。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 Origin 8.0 软件进行分析,各组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tautomycetin 抑制 MCF-7/ADR 细胞的增殖

实验结果(图 1、2)显示,tautomycetin 抑制 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞增殖的 IC₅₀ 值分别为 (0.35 ± 0.04) μmol/L 和 (1.26 ± 0.12) μmol/L。不同浓度的 tautomycetin 作用于 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞 72 h,对两种细胞的生长抑制均成剂量依赖性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同一浓度 tautomycetin 作用下,耐药 MCF-7/ADR 细胞增殖的抑制率随时间延长而增加。由此说明,tautomycetin 对乳腺癌耐药 MCF-7/ADR 细胞同样具有较强的生长抑制作用,并呈剂量和时间依赖性。

2.2 Tautomycetin 诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡

为了验证 tautomycetin 能否诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡,通过 Annexin V-PI 双染色进行流式细胞术检测。结果(图 3)显示,对照组早期凋亡和晚期

凋亡细胞比例分别为(0.67 ± 0.18)%和(0.96 ± 0.23)%;而1 μmol/L tautomycetin 处理组分别为(17.2 ± 3.8)%和(28.4 ± 5.7)%,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。由此说明,tautomycetin 有较强诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡的能力。

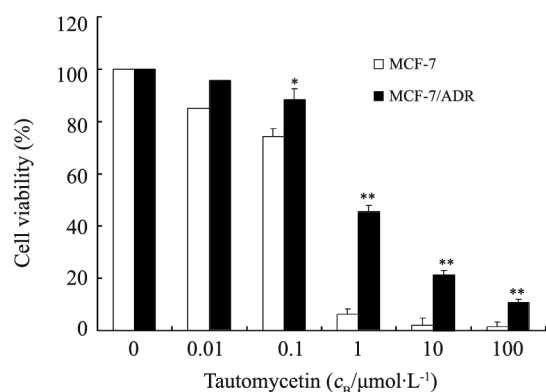


图1 不同浓度 tautomycetin 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of tautomycetin on proliferation of MCF-7 and MCF-7/ADR cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μmol/L

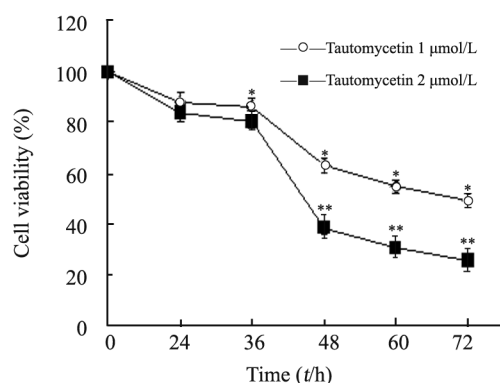


图2 Tautomycetin 作用不同时间对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of tautomycetin on proliferation of MCF-7/ADR cells after treatment for different time periods

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h

2.3 Tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞 caspase 的激活作用

正常细胞中, caspase 都以无活性的酶原形式 (pro-caspase) 存在, 酶原形式被切割成为活化的 caspase 后, 才会执行其功能。Western blotting 检测结果(图4)显示, 用0.5、1 μmol/L tautomycetin 分别处理 MCF-7/ADR 细胞 12、24 h, 随 tautomycetin 浓

度的增加, 细胞中 pro-caspase-7 和 pro-caspase-9 蛋白表达量逐渐降低, 相对应活化的 caspase 表达量逐渐升高, 呈明显的剂量依赖关系。而 pro-caspase-8 蛋白表达量与未处理对照组相比无显著变化, 也未检测到活化 caspase-8 表达量的升高(以 GAPDH 为内参)。由此可见, tautomycetin 可能通过 caspase-9 和 caspase-7 活化途径诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡。

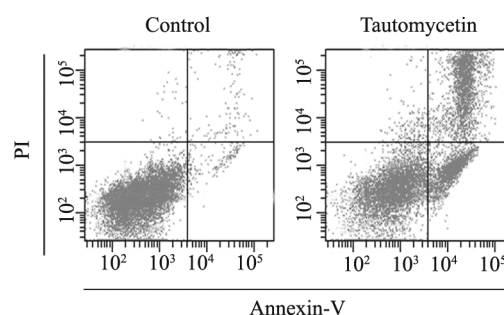


图3 Tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of tautomycetin on apoptosis of MCF-7/ADR cells

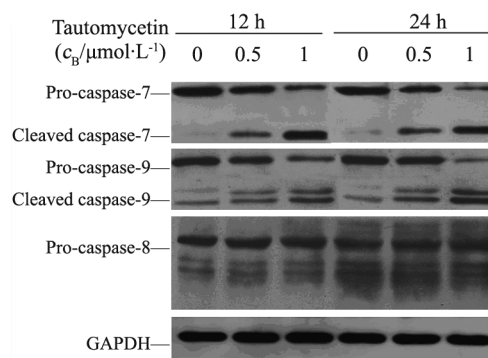


图4 Tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞中 caspase-7、-8、-9 活化的影响

Fig. 4 Effects of tautomycetin on activation of caspase-7, -8 and -9 in MCF-7/ADR cells

2.4 Tautomycetin 对 MCF-7/ADR 细胞中 Bcl-2 和 Cyto-C 蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果(图5)显示, 用0.5、1 μmol/L tautomycetin 分别处理 MCF-7/ADR 细胞 12、24 h, 随 tautomycetin 浓度的增加, MCF-7/ADR 细胞中 Bcl-2 蛋白表达量逐渐降低; 而 Cyto-C 蛋白表达量逐渐升高, 两者都呈明显的剂量依赖关系。结果说明, tautomycetin 可以下调 MCF-7/ADR 细胞内 Bcl-2 的表达, 并促进线粒体释放 Cyto-C。

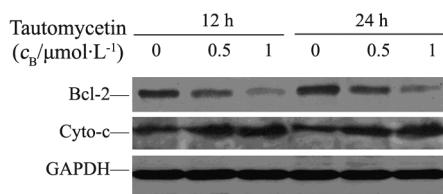


图5 Tautomycetin对MCF-7/ADR细胞
Bcl-2和Cyto-C蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of tautomycetin on expressions
of Bcl-2 and Cyto-C proteins in MCF-7/ADR cells

2.5 Tautomycetin对MCF-7/ADR细胞P53表达和Akt磷酸化的影响

Western blotting检测结果(图6)显示,用0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ tautomycetin分别处理MCF-7/ADR细胞12、24 h,随tautomycetin浓度的增加,Akt蛋白的磷酸化水平逐渐降低,呈明显的剂量依赖关系;而P53蛋白表达量与未处理对照组相比无显著变化。说明tautomycetin可以阻断Akt在MCF-7/ADR细胞中的激活,但是其诱导的凋亡不依赖于P53蛋白活性。

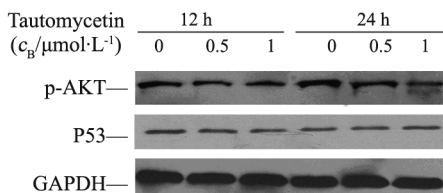


图6 Tautomycetin对MCF-7/ADR
细胞中P53蛋白表达和Akt磷酸化的影响

Fig. 6 Effects of tautomycetin on expression
of P53 protein and phosphorylation
of Akt in MCF-7/ADR cells

3 讨论

目前,由于各种原因导致的人类肿瘤的发病率逐渐上升,由此引发了对新型抗肿瘤药物的更多的需求,因此对于这些新型抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞生长作用机制的研究也就显得越发重要。研究^[5-7]发现,许多抗肿瘤药物可通过影响细胞周期,使肿瘤细胞停滞在 G_0/G_1 或 G_2/M 期,或者通过诱导细胞凋亡而发挥作用^[8-9]。目前对tautomycetin抗肿瘤作用的研究较少,且不同细胞反应不同。本课题组前期研究^[10]发现,tautomycetin对MCF-7乳腺癌细胞生长有明显的抑制作用。肿瘤产生耐药性是影响乳

腺癌化疗效果的重要因素之一,本实验进一步研究tautomycetin对乳腺癌耐药细胞株MCF-7/ADR生长及凋亡的影响,并阐明其诱导MCF-7/ADR细胞凋亡的机制。

本研究表明,tautomycetin抑制MCF-7和MCF-7/ADR细胞生长的 IC_{50} 值分别为(0.35 ± 0.04) $\mu\text{mol/L}$ 和(1.26 ± 0.12) $\mu\text{mol/L}$,相差不到4倍,而一般对耐药细胞不敏感的药物, IC_{50} 值相差几十倍以上,说明tautomycetin对乳腺癌耐药MCF-7/ADR细胞株同样具有较强的生长抑制作用。随后通过流式细胞术检测发现,tautomycetin对MCF-7/ADR细胞有很强的凋亡诱导作用。

细胞凋亡的信号转导通路主要有两条:其一是死亡受体介导的凋亡通路,主要靠caspase-2、-8、-10被募集并激活;另一条通路是线粒体/细胞色素C介导的凋亡通路,通过级联激活caspase-9。两条凋亡通路激活后,最后都是通过活化caspase-3、-5、-7诱导细胞凋亡^[11-12]。由于MCF-7细胞中并不存在活化的caspase-3,而以酶原前体的形式存在^[13-14]。因此本研究选择凋亡效应因子caspase-7进行了检测,结果提示,tautomycetin可能通过caspase-9和caspase-7诱导凋亡。进一步检测发现,细胞内Bcl-2的表达量降低,线粒体Cyto-C的释放显著增加。上述结果表明,tautomycetin主要是通过线粒体/细胞色素C介导的凋亡通路诱导MCF-7/ADR细胞凋亡。

随后本研究进一步探讨了tautomycetin诱导MCF-7/ADR细胞凋亡与上游靶点P53的关系。P53与细胞凋亡有着密切的关系^[15]。研究^[16-17]表明,P53可以作为转录因子,调控下游多种凋亡相关蛋白的表达。本实验结果表明,tautomycetin对MCF-7/ADR细胞中P53蛋白的表达无明显影响,说明tautomycetin对MCF-7/ADR细胞的凋亡诱导作用并不依赖于P53,存在其它上游作用靶点。

Akt在可促进细胞增殖,促进细胞运动、侵袭,抑制细胞凋亡,在抵抗化疗和放疗中起核心作用。Akt的异常持续活化与肿瘤细胞产生耐药性也密切相关^[18]。Akt可以直接或者通过Raf-1磷酸化Bad蛋白,从而终止Bad在线粒体膜上对Bcl-2蛋白的拮抗作用,恢复Bcl-2蛋白的抗凋亡功能^[19]。Procaspase-9是Akt的一个直接作用底物,Akt可以通过磷酸化procaspase-9使其失活。Akt也可抑制由细胞色素C诱导的caspase-3和caspase-9的激活^[20-21]。本研究结果表明,tautomycetin可以显著降低MCF-7/ADR细胞中Akt的磷酸化水平,阻断Akt

在 MCF-7/ADR 细胞中的激活。

总之,本研究表明,tautomycetin 可以阻断耐药 MCF-7/ADR 细胞中 Akt 活化,可能以 P53 非依赖的方式通过线粒体/细胞色素 C 介导的凋亡通路诱导 MCF-7/ADR 细胞凋亡。本研究为今后进一步研究 tautomycetin 抗肿瘤作用的机制及其临床应用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Abaan OD, Mutlu PK, Baran Y, et al. Multidrug resistance mediated by MRP1 gene overexpression in breast cancer patients [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(2): 201-205.
- [2] Nakai E, Park K, Yawata T, et al. Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(9): 901-908.
- [3] Cheng XC, Kihara T, Ying X, et al. A new antibiotic, tautomycetin [J]. *J Antibio*, 1989, 42(1): 141-144.
- [4] Lee JH, Lee JS, Kim SE, et al. Tautomycetin inhibits growth of colorectal cancer cells through p21^{cip}/WAF1 induction via the extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(12): 3222-3231.
- [5] Mukherjee P, Winter S. Cell cycle arrest by transforming growth factor β 1 near G₁/S is mediated by acute abrogation of prereplication complex activation involving an Rb-MCM interaction [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(3): 845-856.
- [6] Shibata A, Conrad S, Birraux J, et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G₂ phase [J]. *EMBO J*, 2011, 30(6): 1079-1092.
- [7] Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, et al. Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G₂/M transition [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22): 16978-16990.
- [8] Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases [J]. *Microbiol Mol Bio Rev*, 2000, 64(4): 821-846.
- [9] Bai Y, Mao QQ, Qin J, et al. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 488-493.
- [10] Niu MS, Sun Y, Tang L, et al. Differential effects of tautomycetin and its derivatives on protein phosphatase inhibition, immunosuppressive function and antitumor activity [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012, 16(2): 145-151.
- [11] Alsabe HR, Wilson CS, Ahn CW, et al. Expression of bel-2 by breast cancer: A possible diagnostic application [J]. *Mod Pathol*, 1996, 9(4): 439-444.
- [12] Nicholson DW, Thornberry NA. Caspase: Killer proteases [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(8): 299-306.
- [13] Malabika S, Carmen RR, Gema R, et al. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(27): 4323-4327.
- [14] Liang Y, Yan C, Schor NF. Apoptosis in the absence of caspase 3 [J]. *Oncogene*, 2001, 20(45): 6570-6578.
- [15] Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by P53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 9030-9040.
- [16] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by P53 restoration in murine liver carcinomas [J]. *Nature*, 2011, 445(7128): 656-660.
- [17] Sangster-Guity N, Conrad BH, Papadopoulos N. ATR mediates cisplatin resistance in a P53 genotype-specific manner [J]. *Oncogene*, 2011, 30(22): 2526-2533.
- [18] Knuefermann C, Lu Y, Liu B, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22(21): 3205-3212.
- [19] Sakamaki J, Daitoku H, Ueno K, et al. Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(15): 6085-6090.
- [20] Sharma AK, Kline CL, Berg A, et al. The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13): 4474-4483.
- [21] Opel D, Naumann I, Schneider M, et al. Targeting aberrant PI3K/Akt activation by PI103 restores sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10): 3233-3247.

[收稿日期] 2012 - 03 - 11

[修回日期] 2012 - 05 - 16

[本文编辑] 王莹

本期广告目录

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海医元生物基因发展有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四