

doi: 10.3969/j.issn.1007-855x.2009.04.016

在乳腺癌细胞 MCF - 7 中紫杉醇诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 的表达

党英男, 白 洁

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 探讨紫杉醇在人乳腺癌细胞株 MCF - 7 中诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 表达及与其诱导的相关途径. 用不同浓度的紫杉醇刺激 MCF - 7 细胞, MCF - 7 细胞生长受抑制. 通过荧光实时定量 PCR 检测, 发现紫杉醇刺激 MCF - 7 细胞后硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 mRNA 的表达升高. 经荧光素酶活性检测, 得出紫杉醇诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 基因启动子活性的增高. p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 MAPK) 抑制剂, SB203580 抑制了紫杉醇诱导的硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 mRNA 的表达. 因此, 紫杉醇抑制 MCF - 7 细胞生长, 并通过 p38 丝裂原激活蛋白激酶途径诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 表达.

关键词: 乳腺癌; 硫氧还蛋白结合蛋白 - 2; 紫杉醇; 癌细胞

中图分类号: Q291; R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 - 855X(2009)04 - 0073 - 05

Expression of Paclitaxel Inducing TRX - Binding Protein - 2 in MCF - 7 Cells

DANG Ying-nan, BA I Jie

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: The expression of paclitaxel inducing thioredoxin binding protein - 2 (TBP - 2) and the inducing pathway of TBP - 2 in MCF - 7 cell are firstly discussed in this paper. MCF - 7 cells are treated with paclitaxel at different concentrations and the growth of MCF cells is inhibited. The expression of TBP - 2 induced by paclitaxel is examined by Real - PCR. The activity of TBP - 2 reporter is increased by paclitaxel by the Luc assay. The expression of TBP - 2 induced by paclitaxel is inhibited by p38 MAPK kinase inhibitor, SB203580. Thus, paclitaxel inhibits MCF - 7 cell growth and induces TBP - 2 expression through the p38 MAPK kinase pathway.

Key words: breast cancer; TBP - 2; paclitaxel; cancer cells

0 引言

硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 (thioredoxin-binding protein - 2, TBP - 2) 又称维生素 D₃ 上调蛋白 1 (vitamin D₃ up-regulated protein 1, VDUP1) 或硫氧还蛋白相互作用蛋白 (Thioredoxin-interacting protein, Txnip), 分子量约为 46kd, 它不仅参与细胞内氧化还原反应, 还在调节细胞生长、繁殖及凋亡过程中起重要作用^[1-3]. 已有研究显示, 硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 在多种癌症组织中表达降低^[1]. 因此, 硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 与癌症的发生有着密切关系.

紫杉醇 (Paclitaxel) 是从红豆杉属植物中提取的一种复杂单体双萜类次生代谢产物. 它通过抑制微管

收稿日期: 2008 - 12 - 30 基金项目: 云南省中青年学术技术带头人后备人才基金资助项目 (2006YP01 - 07); 云南省科技计划项目联合专项 (C0501030).

第一作者简介: 党英男 (1983 -), 女, 在读硕士研究生. 主要研究方向: 硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 与肿瘤 (乳腺癌) 的相关性. E - mail: jiebai662001@yahoo.com.cn

解聚抑制细胞分裂,从而起到抑制肿瘤生长的作用,对乳腺癌及卵巢癌具有良好的疗效^[4]。然而,紫杉醇除了抑制微管解聚外,其余抗肿瘤的作用机理还不十分清楚。为了进一步研究紫杉醇抗肿瘤的分子机制,我们用紫杉醇刺激乳腺癌细胞株 MCF-7,检测细胞中 TBP-2 的表达变化,从而探讨硫氧还蛋白结合蛋白-2 在紫杉醇抗癌中的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院昆明动物研究所。细胞生长在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中,在 37℃,5% CO₂,相对湿度 95% 的细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂及培养液

1640 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司;紫杉醇购自上海康久公司;RNA iso 试剂购自 TaKaRa 公司;TaqDNA 聚合酶、dNTP 混合物均为 Fermentas 试剂;PCR 引物及探针由上海生工公司合成;硫氧还蛋白结合蛋白-2 报告基因质粒 TBP-2-LUC 和对照质粒 TATA-LUC 由日本京都大学增谷弘先生提供;Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;SB203580 抑制剂购自 Biosource 公司;双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.3 方 法

1.3.1 紫杉醇浓度依赖实验

以不同浓度的紫杉醇(0 nmol/L, 2.5 nmol/L, 5.0 nmol/L, 8.0 nmol/L, 10.0 nmol/L)作用 MCF-7 细胞 24 h,通过荧光实时定量 PCR 检测细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达。首先用 RNA iso 提取细胞总 RNA,将 RNA 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像仪观察 RNA 质量;之后使用反转录试剂盒将 RNA 2 μL 合成 20 μL cDNA 模板,其中试剂用量为: oligo(dT)¹⁸ Primer 1 μL, DEPC H₂O 10 μL, 5×Reaction Buffer 4 μL, Ribolock™ Ribonuclease inhibitor 1 μL, 10mM dNTP mix 2 μL, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL(阴性对照中不加);最后通过荧光实时定量 PCR,检测硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达,并以 GAPDH mRNA 表达作为内对照。扩增硫氧还蛋白结合蛋白-2 引物 F-5'-GGATCCAGCAGTGCAAAC-3(174bp-194bp); R-3'-AAGCCGAAGTGTACTCA TATTTGT-5(284bp-308bp);探针 5'-FAM-AGTACCTGCGCTATGAA GACACGCTT-TAMRA-3(203bp-228bp)。GAPDH 的 F-5'-CAAGGCTGAGAACGGGAAG-3(181bp-200bp); R-3'-GGTGAA GACGCCAGTGGACT-5(290bp-308bp);探针 5'-FAM-ATCCCA TCACCA TCTTCCA GGAGCG-TAMRA-3(215bp-239bp)。Real-PCR 反应体系为 50 μL,扩增条件为 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 8 min, 4℃ 1 min。

将 10 μmol/L p38 丝裂原激活蛋白激酶抑制剂, SB203580 与紫杉醇同时刺激 MCF-7 细胞,观察细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达变化情况,确定 TBP-2 的诱导途径。

1.3.2 质粒转染实验

按质粒转染试剂盒的使用说明,分别转染硫氧还蛋白结合蛋白-2 报告基因质粒 TBP-2-LUC 和对照质粒 TATA-LUC。首先,将 MCF-7 细胞排板后在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,培养 24 h 之后,用不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,分别稀释质粒 TBP-2-LUC 和 TATA-LUC 及转染试剂 Lipofectamine™ 2000,室温放置 15~20 min 后转染细胞。转染细胞 24 h 后,紫杉醇加入培养 24 h,收集细胞并裂解,通过对荧光素酶活性的测定,检测紫杉醇作用后硫氧还蛋白结合蛋白-2 启动子的活性。

1.3.3 荧光素酶活性的测定

采用 Promega 公司双荧光素酶活性测定试剂盒,细胞转染 48 h,紫杉醇作用 24 h 后,进行荧光素酶活性测定。先用裂解液裂解转染细胞,之后测定荧光素酶(Luc)和海洋肠腔荧光素酶(pRL)的活性,后者反映每孔转染效率。每次转染 2 个孔。

2 结果

2.1 MCF - 7 细胞在紫杉醇作用下增殖减少

用浓度为 (a): 0 nmol/L (对照组)、(b): 2.5 nmol/L、(c): 5.0 nmol/L、(d): 8.0 nmol/L、(e): 10.0 nmol/L 的紫杉醇分别作用 MCF - 7 细胞 24 h, 10 ×10 倍光镜下观察, 药物作用后细胞仍贴壁良好, 形态呈不规则椭圆形, 细胞无明显凋亡形态见图 1. 但细胞计数显示: 加入不同浓度的紫杉醇后, MCF - 7 细胞生长与对照组相比细胞数减少, 在紫杉醇浓度为 8.0 nmol/L 时细胞增殖明显减少见图 2.

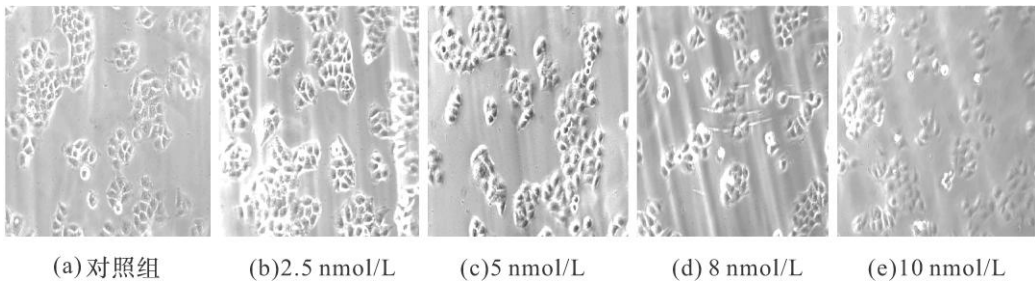


图 1 紫杉醇作用下 MCF - 7 细胞形态

Fig 1 The morphology of the MCF - 7 cells after treatment of paclitaxel

2.2 紫杉醇诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 表达增加

首先, 用凝胶成像系统检测提取总 RNA 有无降解见图 3 (a), 之后经 RT 合成 cDNA, 经荧光实时定量 PCR 检测细胞中硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 和 GAPDH mRNA 表达水平, 以 GAPDH 的 mRNA 表达为内对照, 结果发现不同浓度的紫杉醇 (0 nmol/L, 2.5 nmol/L, 5.0 nmol/L, 8.0 nmol/L, 10.0 nmol/L) 处理 MCF - 7 细胞 24 h, 细胞中硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 表达随药物作用浓度增加而提高, 在浓度为 8.0 nmol/L 时, 硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 表达显著升高, 之后有所下降. 这说明, 紫杉醇在一定浓度范围内诱导 MCF - 7 细胞中硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 表达并呈现一定剂量依赖性, 该实验重复进行 3 次, 均获得类似结果, 下图为 3 次的平均结果, 并用 SPSS 软件进行 t 检验见图 3 (b).

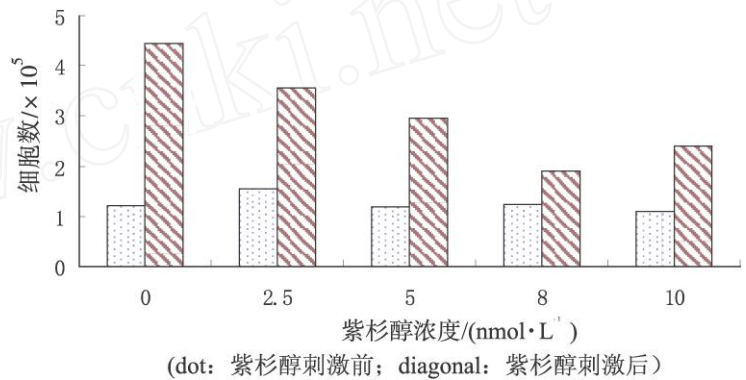
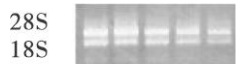


图 2 紫杉醇作用下 MCF - 7 细胞增殖减少

Fig 2 The proliferation of the MCF - 7 cells inhibited by paclitaxel



(a) 凝胶成像系统检测

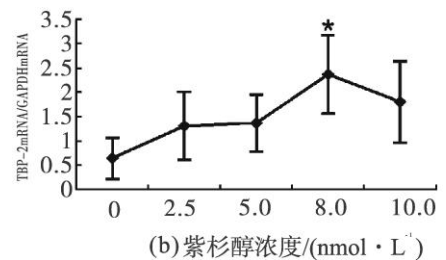


图 3 紫杉醇作用下 MCF - 7 细胞中硫氧还蛋白结合蛋白 - 2mRNA 表达

Fig 3 The expression of TBP - 2mRNA induced by paclitaxel in MCF - 7 cells

2.3 紫杉醇诱导硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 启动子表达

将硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 报告基因质粒 TBP - 2 - LUC 和对照质粒 TA TA - LUC 瞬时转染 MCF - 7 细胞 24 h 后, 用 8.0 nmol/L 紫杉醇刺激 24 h, 之后用双荧光素酶活性测定检测硫氧还蛋白结合蛋白 - 2 启

动子活性,发现细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2启动子活性升高约3倍,而对照组质粒在紫杉醇作用下无明显变化.该实验重复进行3次,均获得类似结果,下图为3次的平均结果,并用SPSS软件进行t检验见图4.

2.4 紫杉醇通过 P38 信号通路诱导硫氧还蛋白结合蛋白-2表达

将 $10.0 \mu\text{mol/L}$ SB203580 和 8.0 nmol/L 紫杉醇同时作用于 MCF-7 细胞 24 h,通过荧光实时定量 PCR 检测细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达,发现由紫杉醇诱导的硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达被 SB203580 抑制,而 SB203580 单独作用 MCF-7 细胞时,细胞内硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达与对照组相比无明显变化.该实验重复进行 3 次,均获得类似结果,下图为 3 次的平均结果,并用 SPSS 软件进行 t 检验(见图 5.)

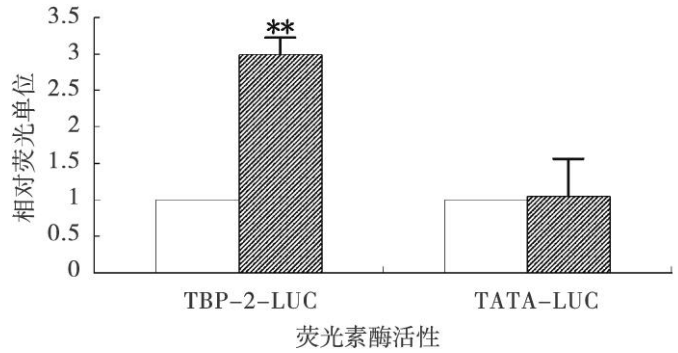


图 4 紫杉醇作用下 TBP-2-LUC 和 TATA-LUC 荧光素酶活性

Fig 4 The activity of TBP-2-LUC and TATA-LUC luciferase after the treatment of paclitaxel

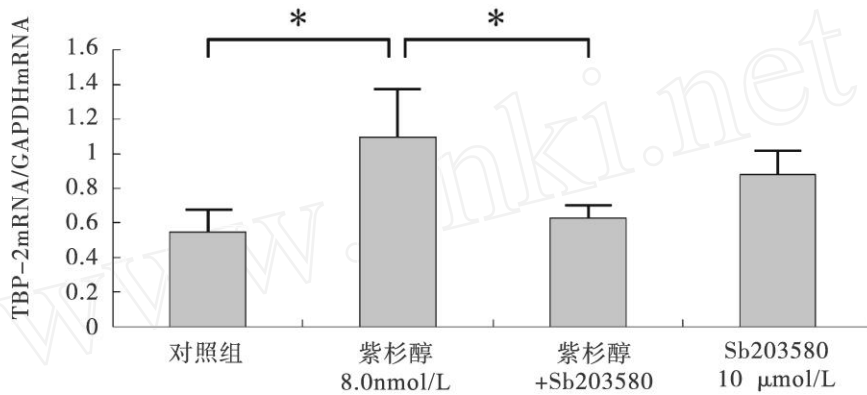


图 5 SB203580 抑制细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达

Fig 5 Expression of TBP-2 mRNA inhibited by SB203580

3 讨论

紫杉醇能有效抑制微管蛋白解聚,从而抑制肿瘤细胞有丝分裂,干扰肿瘤细胞的 G2-M 期的过渡,抑制细胞的生长,是目前治疗乳腺癌的常用药物之一,但其他作用机理还不十分清楚^[4,5].

硫氧还蛋白结合蛋白-2 广泛分布于多种组织细胞中,其中肺组织中的表达量相对较高^[6],而脑组织和肝脏中的表达量相对较低^[7]. 硫氧还蛋白结合蛋白-2 通过两个半胱氨酸残基与硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)结合,抑制硫氧还蛋白的还原作用,硫氧还蛋白结合蛋白-2 高表达时,硫氧还蛋白活性则减少近 50%^[8-10]. 早先证明 1,25-二羟基维生素 D₃ (1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃) 可以诱导 HL-60 白血病细胞株中硫氧还蛋白结合蛋白-2 表达,而且, H₂O₂、射线、UV、生长抑制剂、热刺激、5-FU 等都会诱导细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 表达升高^[10]. 这说明,硫氧还蛋白结合蛋白-2 在多项氧化应激作用下表达增加. 硫氧还蛋白结合蛋白-2 高表达的癌细胞,细胞周期滞留在 G₀-G₁ 期,细胞生长停滞并发生凋亡^[11]. 而在硫氧还蛋白结合蛋白-2 缺失的细胞中, BAX 与 BCL-2 比值降低, caspase-3 活性减少, Akt/Bcl-2 信号通路活化,细胞凋亡随之减少^[12-14]. 因此,硫氧还蛋白结合蛋白-2 具有抑制细胞周期和诱导细胞凋亡的作用. 更重要的是,癌组织中硫氧还蛋白结合蛋白-2 表达减少或者缺失^[11]. 这些探究结果均提示了:硫氧还蛋白结合蛋白-2 表达与肿瘤发生、生长密切相关,硫氧还蛋白结合蛋白-2 具有抑制肿瘤生长的作用.

我们的实验结果显示了不同浓度的紫杉醇作用于乳腺癌细胞株 MCF-7 后, MCF-7 细胞生长缓慢, 细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达增加. 提示了硫氧还蛋白结合蛋白-2 与紫杉醇抗肿瘤作用有关, 紫杉醇可以通过诱导硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 的表达, 抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡. 并且紫杉醇诱导硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达有一定的浓度依赖性, 在 8.0 nmol/L 时最明显, 10.0 nmol/L 有所减低, 这说明在抗肿瘤的治疗过程中, 并不是浓度越大效果越明显, 应有一定的最佳浓度. 因为, p38MAPK 信号通路是诱导细胞凋亡的主要途径, SB203580 是 p38MAPK 的抑制剂. 紫杉醇诱导的硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达被 SB203580 抑制, 因此, 紫杉醇可能通过 P38 信号通路诱导细胞中硫氧还蛋白结合蛋白-2 表达.

4 结 论

研究证实了紫杉醇在 MCF-7 细胞中诱导硫氧还蛋白结合蛋白-2 mRNA 表达并且阐明其诱导途径, 该途径与细胞的凋亡途径有关. 进一步明确了紫杉醇抑制乳腺癌细胞生长的作用分子机制, 提示硫氧还蛋白结合蛋白-2 有可能成为抗肿瘤药物新的作用靶点.

致谢: 感谢日本京都大学增谷弘先生为我们提供硫氧还蛋白结合蛋白-2 报告基因质粒.

参考文献:

- [1] HAN S H, JEON J H, JU H R, et al V D U P 1 Upregulated by TGF- β 1 and 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Tumor Cell Growth by Blocking Cell-Cycle Progression[J]. *Oncogene*, 2003, 22(26): 4035 - 4046
- [2] BILLIOTTI, FURMAN C, LARIGAUDERIE G, et al Enhanced V D U P - 1 Gene Expression by PPAR α Agonist Induces Apoptosis in Human Macrophage[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(1): 183 - 191.
- [3] SCHULZE P C, YOSHIDA J, TAKAHASHI T, et al Hyperglycemia Promotes Oxidative Stress Through Inhibition of Thioredoxin Function by Thioredoxin-Interacting Protein[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30369 - 30374
- [4] ERIC K, ROWNSKY M D, ROSS C, et al Paclitaxel (Taxol) [J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 13(4): 1004 - 1015.
- [5] XIONG H, YU S, ZHANG L, et al Changes of Survivin mRNA and Protein Expression During Paclitaxel Treatment in Breast Cancer Cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2007, 27(1): 65 - 67.
- [6] JUNN E, HAN S H, MIJY, et al Vitamin D₃ Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function[J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6287 - 6295.
- [7] YANG X, YOUNG L H, VOIGT J M. Expression of a Vitamin D regulated Gene (VDUP-1) in Untreated and MNU-treated rat Mammary Tissue[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, 48(1): 33 - 44.
- [8] NISHIYAMA A, MATSUMI, WATA S, et al Identification of Thioredoxin-Binding Protein-2/Vitamin D(3) up-Regulated Protein 1 as a Negative Regulator of Thioredoxin Function and Expression[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 21645 - 21650
- [9] SCHULZE P C, YOSHIDA J, TAKAHASHI T, et al Hyperglycemia Promotes Oxidative Stress Through Inhibition of Thioredoxin Function by Thioredoxin-Interacting Protein[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30369 - 30374
- [10] TAKAHASHI Y, NAGATA T, NISHIYAMA A, et al Up-Regulation of Vitamin D₃ Up-Regulated Protein 1 Gene in Response to 5-Fluorouracil in Colon Carcinoma SW620[J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(1): 75 - 79.
- [11] CHEN J, HUIST, COUTO F M, et al Thioredoxin-Interacting Protein Deficiency Induces Akt/Bcl- α Signaling and Pancreatic β -Cell Mass and Protects Against Diabetes[J]. *FASEB J*, 2008, 22(10): 3581 - 94
- [12] CHEN J, SAXENA G, MUNGRUEIN, et al Thioredoxin-Interacting Protein A Critical Link Between Glucose Toxicity and β -Cell Apoptosis[J]. *Diabetes*, 2008, 57(4): 938 - 44.
- [13] CHEN C L, LINC F, CHANG W T, et al Ceramide Induces p38 MAPK and JNK Activation Through a Mechanism Involving a Thioredoxin-Interacting Protein-Mediated Pathway[J]. *Blood*, 2008, 111(8): 4365 - 74