论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0576-04

PDTC联合紫杉醇降低MDA-MB-231细胞增殖侵袭能力

杨春蓉[1,2],张 徽[1,2],黄 伟[1,2],刘 琼[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:分子医学与肿瘤研究中心[1],病理学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨核因子-κB(NF-κB)抑制剂——吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC)联合紫杉醇(Paclitaxel)对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖侵袭能力的影响。**方法** MTT及FCM法测定细胞增殖和周期变化,RT-PCR检测细胞NF-κB p65 mRNA的变化,Western blot检测细胞NF-κB p65、MMP-9及TIMP-1蛋白表达变化,侵袭、迁移和黏附实验测定细胞侵袭转移能力的改变。**结果** PDTC联合紫杉醇能明显抑制肿瘤细胞生长($P<0.05$),细胞周期阻滞在G_1/G_0期,并可抵消紫杉醇对NF-κB的激活,使NF-κB p65 mRNA及蛋白的表达均降低($P<0.05$)。PDTC降低MDA-MB-231细胞的侵袭转移能力,与紫杉醇联合应用后作用增强($P<0.01$)。**结论** PDTC联合紫杉醇能降低乳腺癌MDA-MB-231细胞的侵袭转移能力,其机制可能与PDTC抑制NF-κB的表达相关。

[关键词] NF-κB;PDTC;乳腺癌;MMP-9;侵袭转移

[中图法分类号] R730.23;R737.9;R979.1 **[文献标志码]** A

Combination of pyrrolidine dithiocarbamate and paclitaxel suppresses proliferation and invasion of MDA-MB-231 cells

Yang Chunrong[1,2], Zhang Hui[1,2], Huang Wei[1,2], Liu Qiong[1,2] ([1]Chongqing Research Centre of Molecular Medicine and Cancer, [2]Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the nuclear factor-κB (NF-κB) inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and paclitaxel on the proliferation and invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** The MDA-MB-231 cells were treated with PDTC (100 μmol/L) or paclitaxel (1 μmol/L), or combined treatment. The effect of proliferation was analyzed by MTT assay. The cell cycle was evaluated by flow cytometry. RT-PCR was used to detect the expression of NF-κB p65 mRNA. Western blotting were used to determing the expression of NF-κB p65, MMP-9 and TIMP-1 in MDA-MB-231 cells after treatment. The invasion ability of MDA-MB-231 cells was tested ty the invasion, migration and cell adhesion assay. **Results** The cell growth was significantly slowed down and the cell cycle was arrested at G_0/G_1 phase after combined treatment. The expression of NF-κB p65 and MMP-9 was downregulated ($P<0.05$) compared with paclitaxel treatment group, and the invasion ability of MDA-MB-231 cells was decreased after combined treatment ($P<0.01$). **Conclusion** PDTC combined with paclitaxel effectively inhibits cell proliferation, induces cell cycle arrest, and decreases cell invasion ability of human breast cancer MDA-MB-231 cells. Its mechanism may be associated with PDTC inhibiting the NF-κB-related gene expression.

[Key words] NF-κB; pyrrolidine dithiocarbamate; breast cancer; MMP-9; invasion and metastasis

Correspongding author: Zhang Hui, E-mail:zhanghui200157@sina.com

乳腺癌是我国常见的恶性肿瘤之一。NF-κB(Nuclear factor-κB)信号通路在大多数肿瘤细胞中都处于持续激活状态。在乳腺癌组织及其细胞系中,NF-κB的高表达与肿瘤细胞的侵袭、转移密切相关[1,2]。吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC)是一种抗氧化剂,也是NF-κB的特异性抑制剂。MMPs(Matrix metalloproteinases)能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的许多蛋白成分从而促进癌细胞的浸润和转移。紫杉醇是目前治疗乳腺癌的有效化疗药物之一。本实验拟通过PDTC联合紫杉醇作用于人乳腺癌细胞株MDA-MB-231,抑制NF-κB在该细胞中的表达,从而抑制其侵袭转移能力,探讨PDTC联合紫杉醇治疗乳腺癌的可行性。

[通信作者] 张 徽,E-mail: zhanghui200157@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料及细胞培养

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231(ER 阴性)由重庆医科大学病理学教研室提供,PDTC 购于美国 Sigma 公司,抗 NF-κB p65、MMP9、TIMP-1 抗体和 Fibronectin(FN)均购自 Santa Cruz 公司(USA),RT-PCR 试剂盒(美国 TaKaRa 公司),引物由重庆升博公司设计合成,Geltrex™基质胶购自 Invitrogen 公司(USA),Millicell 小室购自 Millprore 公司(USA)。MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃,5% CO_2 培养箱中至贴壁。

1.2 实验分组

空白对照组(未加药),PDTC 100 μmol/L 为处理组(MTT 和 FCM 法加测 PDTC 25、50、200 μmol/L),紫杉醇 1 μmol/L 为药物对照组,以先加 100 μmol/L PDTC 孵育 2 h,再加入紫杉醇至终浓度为 1 μmol/L 为联合用药组。

1.3 细胞增殖测定

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,按 2×10^4/ml,200 μl/孔接种于 96 孔板。各组细胞分别培养 24、48、72 h 后,加入 20 μl MTT(5 mg/ml),37 ℃作用 4 h,弃上清,加入 150 μl DMSO,振摇 10 min,酶标仪 490 nm 下测吸光度[D(490)]。细胞的抑制率 = (1 − D(490)实验组/D(490)对照组) × 100%。每组设 5 个复孔,实验重复 3 次。

1.4 细胞周期测定

各组细胞培养 3 d 后消化成单细胞悬液,离心后重悬于 1 ml 700 mol/L 乙醇,固定,4 ℃过夜;离心,加入 20 mg/ml 的核糖核酸酶 10 μl,37 ℃作用 30 min;加入 1 mg/ml 碘化丙碇 400 μl,4 ℃染色 45 min。FCM 分析固定的样品。

1.5 RT-PCR 分析

各组细胞经处理 24 h 后,Trizol 法提取各组细胞的 RNA,以逆转录得到的 cDNA 为模板,检测 NF-κB p65 的基因片段。NF-κB p65(204 bp)上游序列:5′-GGGAAGGAACGCTGTCAGAG-3′,下游序列:5′-TAGCCTCAGGGTACTCCATCA-3′。GAPDH(542 bp)上游序列:5′-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3′,下游序列:5′-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3′。PCR 反应步骤为:94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min,共 30 个循环,72 ℃ 5 min。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,Gel Doc 1000 凝胶成像仪半定量分析,以目的基因与 GAPDH 的扩增条带的光密度比值代表其 mRNA 相对表达水平。

1.6 Western blot 分析

各组细胞经处理 24 h 后,按说明提取蛋白,8% 变性聚丙烯酰氨凝胶垂直电泳,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,封闭后加入 NF-κB p65、MMP-9、TIMP-1、β-Actin 一抗,过夜后加二抗孵育 1 h,ChemiDocXPS 发光系统显影。目的条带用图像分析软件(Quantity One)进行光密度积分值分析,以目的条带与 β-Actin 光密度的比值作为蛋白表达相对含量。

1.7 侵袭、迁移实验

使用 Millicell 小室,以 40 μl Geltrex™包被微孔膜,37 ℃过夜,各组细胞经处理 24 h 并吹打成单细胞悬液。上室加入 200 μl 含 1×10^5 个细胞的无血清细胞悬液,下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,每组 3 个复孔。培养 4 h,苏木精-伊红染色,高倍镜(×400)下随机选取 5 个视野细胞进行记数。迁移试验的基本步骤同侵袭实验,但上室中不铺 Geltrex™基质胶。

1.8 细胞-基质黏附实验

30 μg/孔 FN 覆盖 96 孔板,4 ℃过夜。BSA 10 mg/ml,封闭 2 h,5×10^4/ml 预处理的细胞悬液接种 200 μl/孔,孵育 2 h。弃上清,按 MTT 法检测 630 nm 波长下各组吸光度值[D(630)]。

细胞相对黏附率 = [D(630)实验组/D(630)对照组] × 100%

1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS 9.0 统计软件,单变量两组资料之间的比较用 t 检验,多组资料之间的比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 PDTC 与紫杉醇对细胞增殖的影响

两种药物均明显抑制细胞生长,实验组作用呈剂量-时间依赖性,PDTC 25、50 μmol/L 组对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率低于紫杉醇组($P<0.05$),而 PDTC 100、200 μmol/L 组与紫杉醇组相比,差别没有统计学意义($P>0.05$)。联合用药组的 72 h 抑制作用最明显,与紫杉醇组相比差别有统计学意义($P<0.05$)。结果表明 PDTC 联合紫杉醇能显著降低 MDA-MB-231 细胞的增殖活性。见表 1。

表 1 PDTC 和紫杉醇对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制作用

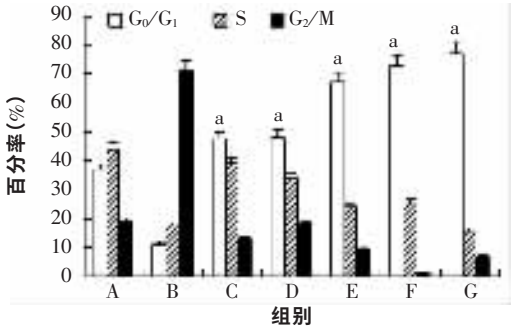
[$n=3$, ($\bar{x}\pm s$)%]

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
PDTC 25 μmol/L 组	7.546 ± 2.987[a]	11.649 ± 3.371[a]	17.554 ± 3.716[a]
PDTC 50 μmol/L 组	11.957 ± 2.739[a]	14.035 ± 2.568[a]	21.674 ± 2.465[a]
PDTC 100 μmol/L 组	22.924 ± 5.182	27.343 ± 3.841	32.656 ± 4.880
PDTC 200 μmol/L 组	24.852 ± 5.167	29.370 ± 3.605	35.491 ± 5.831
紫杉醇 1 μmol/L 组	21.869 ± 4.511	27.280 ± 4.286	34.568 ± 5.577
联合用药组	54.557 ± 5.942[a]	59.465 ± 1.284[a]	64.937 ± 3.695[a]

a: $P<0.05$ 与紫杉醇 1 μmol/L 组比较

2.2 PDTC 与紫杉醇对细胞周期的影响

与空白对照组相比,处理组细胞 G_0/G_1 期百分比升高,PDTC 100 μmol/L 组为(67.200 ± 1.948)%,S 期细胞数减少($P<0.05$),且呈剂量依赖性,提示处理组细胞发生 G_0/G_1 期停滞。紫杉醇组细胞发生了 G_2/M 期停滞(71.127 ± 8.912)%,而联合用药组 G_0/G_1 期细胞比例(77.173 ± 4.257)%,与空白对照组(36.703 ± 3.728)% 相比明显增加,差别有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较

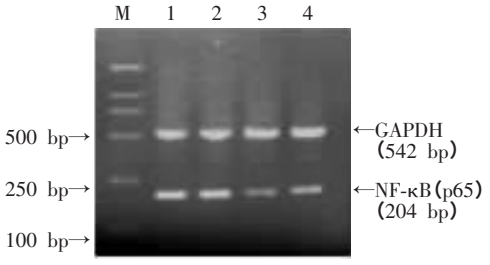
A：空白对照组；B：紫杉醇组；C-F：PDTC 25，50，100，200 μmol/L组；G：联合用药组

图1 PDTC联合紫杉醇对MDA-MB-231细胞周期的影响

[$n=3$，$(\bar{x}\pm s)\%$]

2.3 MDA-MB-231细胞NF-κB p65 mRNA表达的变化

处理组(0.273±0.119)和联合用药组(0.368±0.033)细胞NF-κB p65 mRNA表达均降低，与空白对照组(0.711±0.024)比较差异显著($P<0.05$)。紫杉醇组与空白组相比无显著差异($P>0.05$)。见图2。

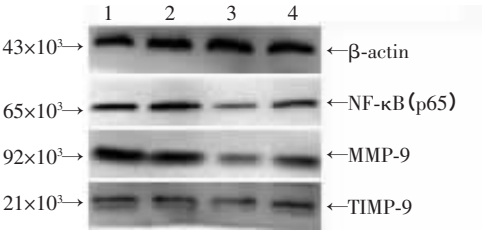


1：空白对照组；2：紫杉醇组；3：PDTC 100 μmol/L组；4：联合用药组；M：DNA标准

图2 PDTC和紫杉醇对MDA-MB-231细胞NF-κB p65 mRNA表达的影响

2.4 MDA-MB-231细胞NF-κB p65、MMP-9、TIMP-1蛋白表达的变化

处理组细胞NF-κB p65、MMP-9蛋白表达降低[(0.279±0.165)、(0.222±0.124)]，与空白对照组[(0.600±0.098)、(0.516±0.106)]比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。紫杉醇组与空白组相比，差别没有统计学意义($P>0.05$)。联合用药组[(0.304±0.146)、(0.257±0.111)]，与空白对照组相比显著降低($P<0.05$)。各组对TIMP-1的表达水平没有显著影响。如图3。



1：空白对照组；2：紫杉醇组；3：PDTC 100 μmol/L组；4：联合用药组

图3 PDTC和紫杉醇对MDA-MB-231细胞NF-κB(p65)、MMP-9、TIMP-1表达的影响

2.5 MDA-MB-231细胞侵袭转移能力的变化

空白对照组侵袭和迁移实验的过膜细胞数分别为(97±3)、(109±6)，处理组MDA-MB-231细胞的过膜细胞数明显减少(32±1)、(48±3)($P<0.05$)；两药联合后，过膜细胞数(14±3)、(18±1)明显低于空白对照组($P<0.01$)。结果表明PDTC联合紫杉醇能显著降低MDA-MB-231细胞的侵袭转移能力。如图4。

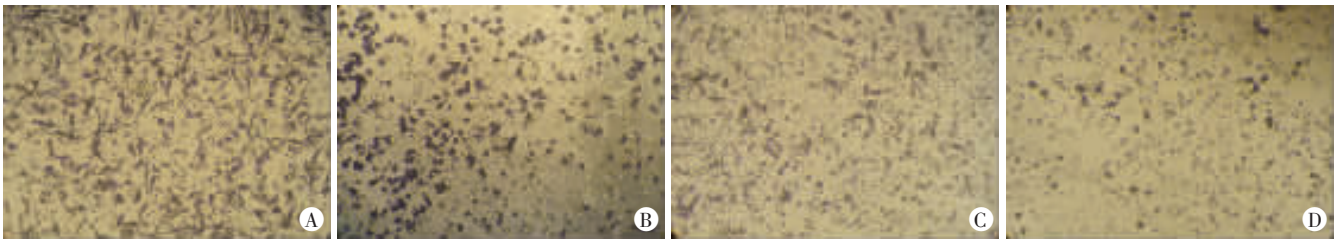
2.6 MDA-MB-231细胞黏附率的变化

紫杉醇组细胞的相对黏附性为(0.980±0.086)，PDTC 100 μmol/L组和紫杉醇组相比，黏附率(0.371±0.060)降低($P<0.05$)，而PDTC与紫杉醇联合作用阻断NF-κB信号传导通路后，MDA-MB-231细胞对ECM的黏附率(0.119±0.012)明显减弱，与单用药组相比差别有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

NF-κB是一种重要的基因转录调节因子[1]，在大多数乳腺癌组织及人类乳腺癌细胞系中也存在NF-κB的持续激活，激活的NF-κB可以促进乳腺癌细胞增殖和侵袭转移、抑制其凋亡，在乳腺癌的发生、发展过程中发挥着重要作用[2]。

MMPs/TIMPs的相对平衡决定着细胞外基质的降解和聚集，从而影响恶性肿瘤的浸润和转移能力[3]。其中MMP-9参与ECM的Ⅳ型、Ⅴ型胶原和明胶的降



A：空白对照组；B：紫杉醇组；C：PDTC 100 μmol/L组；D：联合用药组

图4 PDTC和紫杉醇对MDA-MB-231细胞侵袭转移能力的影响 (HE ×400)

解[4],在肿瘤的血管新生、浸润和转移等过程中扮演着更加重要的角色。同时,宿主细胞或肿瘤细胞自身可产生天然抑制剂蛋白因子TIMPs[5],TIMPs通过抑制MMPs的活性,维持细胞外基质及基膜的完整性,抑制新生血管的形成,阻止肿瘤细胞进入血液循环形成转移灶[6]。癌变时MMP和TIMP表达均上调,当TIMP增高程度不足以抑制MMP的活性时,两者之间的平衡被打破,就会导致ECM的过度降解,从而促进肿瘤的浸润转移。

PDTC是NF-κB的特异性抑制剂,也是一种强抗氧化剂,能特异性抑制NF-κB的P65亚单位表达或抑制IκB降解,减少NF-κB的核移位,从而抑制其活性[7]。紫杉醇是一种有效的植物抗癌药,作用于微管蛋白,能促进微管聚合,抑制微管解聚,使细胞分裂阻滞于G_2/M期,最终导致细胞死亡[8]。本实验结果表明PDTC和紫杉醇均对MDA-MB-231细胞生长具有明显抑制作用,存在剂量依赖效应,二者联合应用后细胞的增殖能力明显下降,细胞周期阻滞在G_0/G_1期。结果显示PDTC 100 μmol/L与紫杉醇1 μmol/L对MDA-MB-231细胞增殖影响的差异无统计学意义且抑制率均小于50%,因此选取该浓度比较两种药物对细胞侵袭转移能力的影响。

紫杉醇在导致发生周期阻滞作用的同时,也可以使IκB激酶表达增加,IκB蛋白发生磷酸化而被降解,反过来促进NF-κB进入细胞核,从而使肿瘤细胞逃避杀伤作用而存活,降低了其疗效[9]。Huang等[10]报道紫杉醇能诱导IκB-α的降解从而激活NF-κB,促进其诱导的凋亡。NF-κB促进肿瘤转移可能与上调血管生成因子以及MMPs的表达有关,而非直接作用[11]。本实验Western blot和RT-PCR结果均显示空白对照组与紫杉醇组的NF-κB P65、MMP-9蛋白和NF-κB P65的mRNA表达均升高,而TIMP-1表达没有明显变化,从而使MMP-9/TIMP-1比值升高;而PDTC则能阻断NF-κB,使细胞NF-κB P65和MMP-9蛋白表达和NF-κB P65的mRNA表达均下降,TIMP-1表达没有明显影响,进而MMP-9/TIMP-l比值下降($P<0.05$)。提示PDTC与紫杉醇联合应用后,阻断了紫杉醇引起的NF-κB的激活,后通过信号通路将信号传递至核内,改变MDA-MB-231细胞的基质侵袭相关基因MMP-9,TIMP-l的转录水平,进而降低了乳腺癌细胞的侵袭转移能力。与侵袭及迁移黏附实验的结果相符。可见NF-κB信号通路的激活是乳腺癌病情进展的关键机制之一,可作为理想的治疗靶点。

本研究将常用抗肿瘤药物紫杉醇与NF-κB特异性抑制剂PDTC联合应用于乳腺癌MDA-MB-231细胞株,探讨两种药物对细胞侵袭转移能力的影响及机制。结果表明,PDTC能明显抑制细胞生长(呈剂量-时间依赖性),降低NF-κB P65mRNA的表达,同时通过抑制侵袭相关基因MMP-9的表达抵消了紫杉醇对NF-κB的激活,从而降低了细胞的侵袭转移能力。其他相关机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李冬, 戴立里, 余斌斌, 等. 丹参素对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及NF-κB活性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(8): 724-728.

[2] Baud V, Jacque E. The alternative NF-κB activation pathway and cancer: friend or foe? [J]. Med Sci (Paris), 2008, 24(12): 1083-1088.

[3] Vihinen P, Kahari V M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets[J]. Int J Cancer, 2002, 99(2): 157-166.

[4] 秦蓁, 罗彬, 王旭东. 肺癌MMP-9表达与血管生成的关系及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 595-597.

[5] Hoikkala S, Paakko P, Soini Y, *et al*. Tissue MMP-2 and MMP-9 [corrected] are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2--complex or TIMP-1 [corrected] in stage [corrected] I-III lung carcinoma[J]. Cancer Lett, 2006, 236(1): 125-132.

[6] Stetler-Stevenson W G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities[J]. Sci Signal, 2008, 1(27): re6.

[7] Nuutinen U, Simelius N, Ropponen A, *et al*. PDTC enables type I TRAIL signaling in type II follicular lymphoma cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(6): 829-836.

[8] Pandita D, Ahuja A, Velpandian T, *et al*. Characterization and in vitro assessment of paclitaxel loaded lipid nanoparticles formulated using modified solvent injection technique[J]. Pharmazie, 2009, 64(5): 301-310.

[9] 吴峰, 王清明, 范国才, 等. 紫杉醇诱导MCF-7乳腺癌细胞凋亡的蛋白质组研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 418-421.

[10] Huang Y, Fan W. IkappaB kinase activation is involved in regulation of paclitaxel-induced apoptosis in human tumor cell lines[J]. Mol Pharmacol, 2002, 61(1): 105-113.

[11] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, *et al*. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(5A): 3579-3583.

(**收稿**:2009-09-08;**修回**:2009-10-03)

(编辑 龙 亮)