DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.013
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1339-03

论著

胆固醇合成抑制剂洛伐他汀对MCF-7乳腺癌细胞MAPK活性的影响

韦 娜,糜漫天,朱俊东,郎海滨 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胆固醇合成抑制剂洛伐他汀对MCF-7乳腺癌细胞丝裂泵活化蛋白激酶MAPK活性的影响。方法 4、8、16 μmol/L终浓度的洛伐他汀处理上皮来源的MCF-7乳腺癌细胞,Western blotting分析ERK1和$p38^{MAPK}$蛋白表达,激酶活性分析ERK1和$p38^{MAPK}$的磷酸化水平。结果 不同剂量的洛伐他汀处理48~72 h,对ERK1蛋白表达无显著影响,但在72 h后能下调$p38^{MAPK}$蛋白表达,同时洛伐他汀处理48~72 h均能明显降低ERK1和$p38^{MAPK}$磷酸化水平,二者具有相同趋势。结论 洛伐他汀处理MCF-7乳腺癌细胞可能通过抑制细胞的甲羟戊酸途径,或影响胞内酪氨酸激酶磷酸化水平等,下调细胞MAPK活性。

关键词:洛伐他汀;MCF-7细胞;蛋白表达;磷酸化水平;MAPK活性
中图法分类号:R345.5+7;R737.9;R979.1 文献标识码:A

Effects of cholesterol-inhibitor lovastatin on the activity of MAPK in MCF-7 breast cancer cells

WEI Na, MI Man-tian, ZHU Jun-dong, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of lovastatin on MAPK activity in MCF-7 breast cancer cells. **Methods** After MCF-7 cells were treated with 4, 8 and 16 μmol/L lovastatin for 48~72 h, the expressions of ERK1 and $p38^{MAPK}$ proteins were detected by Western blotting. Their phosphorylation levels were observed by kinase activity assay. **Results** MCF-7 cells treated with different doses of lovastatin for 48~72 h had no significant effect on the protein level of ERK1, but the activities of ERK1 and the $P38^{MAPK}$ proteins were down-regulated at 72 h after treatment. **Conclusion** Lovastatin may down-regulate the activity of MAPK in MCF-7 cells by means of inhibiting the mevalonate metabolism pathway and/or affecting phosphorylation levels.

Key words: lovastatin; MCF-7 cell; protein expression; phosphorylation levels; MAPK activity

洛伐他汀(Lovastatin, LOV)等他汀类(Statins)是羟甲基戊二酰单酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶的抑制剂,能降低细胞胆固醇生物合成及抑制甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径,现广泛用于临床高脂血症治疗。目前有研究显示LOV能抑制多种肿瘤细胞增殖,诱导其分化成熟或凋亡的发生,具有潜在的抗肿瘤功效[1]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一类胞浆内广泛分布的含有丝/苏氨酸残基的蛋白质激酶,其信号传导通路在真核生物细胞的生长、分化、细胞周期调节和凋亡过程中发挥重要作用,但研究显示MAPK活性的异常与肿瘤的发生关系密切。本实验拟通过3种不同浓度的LOV,来观察对MCF-7乳腺癌细胞ERK1和$p38^{MAPK}$蛋白表达水平及活性的影响,进而深入探讨LOV抗肿瘤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 洛伐他汀(Lovastatin, LOV) Fluka公司产品,溶于二甲亚砜(DMSO)中,储存浓度为3.2×10^4 μmol/L,-20 ℃保存。LOV处理细胞终浓度分别为4、8、16 μmol/L。

1.1.2 抗体 羊抗ERK1和兔抗$p38^{MAPK}$抗体均为Santa cruz公司产品,羊抗ERK1 1∶300、兔抗$p38^{MAPK}$ 1∶250稀释后使用,SP-9001、SP-9003试剂盒购自北京中山生物试剂有限公司。

1.2 细胞株的培养

MCF-7乳腺癌细胞株由中国科学院上海细胞所提供。细胞在含10%热灭活小牛血清的DMEM高糖培养基中常规传代。

1.3 Western blotting分析ERK1、$p38^{MAPK}$蛋白表达

1.3.1 细胞总蛋白的提取 以2.5×10^5个/ml细胞密度接种,处理48、72 h后,常规收获各组细胞,1×10^7个细胞中加入100 μl预冷至0 ℃的NP-40裂解液(50 mmol/L, pH 8.0的Tris-Cl,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271128)
作者简介:韦 娜(1973-),女,重庆市人,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752291
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaF, 5 mmol/L $Na_4P_2O_7$, 0.1% NP-40, 10 μg/ml Aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1 mmol/L PMSF) 裂解, 冰上放置 30 min, 4 ℃、12 000× g 离心 15 min, 将上清收集至另一微量离心管。

1.3.2 蛋白质浓度测定 按 Lowry 比色法, 以 BSA 为标准蛋白, 用 Eppendorf Biophotometer 仪测定样品蛋白浓度。

1.3.3 Western blotting 分别取各组不同组分蛋白 15 μl 样品, 加入 15 μl 2× SDS 加样缓冲液, 沸水中煮沸 5 min, 经 10% SDS-PAGE 电泳后电转移转膜, 1% BSA 封闭 37 ℃、1 h, 分别加入稀释后的一抗 37 ℃孵育 1 h, 特异性二抗及 SP-HRP 孵育 37 ℃、1 h, 再用 0.05% DAB, 0.03% H_2O_2, 50 mmol/L Tris pH 7.6 缓冲液显色 3 min。

1.4 细胞外调节蛋白激酶(ERK1 和 $p38^{MAPK}$)活性测定[2]

将各组胞浆蛋白调至 200 μg/150 μl, 分别与抗 ERK1 和 $p38^{MAPK}$ 抗体 1 μg/5 μl 4 ℃共同温育 4 h, 加入激酶缓冲液(1 mg/ml MBP, 20 mmol/L、pH 7.2 Hepes, 10 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 40 μmol/L ATP, 7.4×10^4 Bq [$\gamma-^{32}$P] ATP, 2 mmol/L Aprotinin, 2 mmol/L Leupeptin, 0.1 mg/ml BSA) 25 μl, 在 25 ℃水浴孵育 30 min, 用 0.5%磷酸中止反应, 经多头细胞分离器吸附于 P81 滤纸上, 用 0.5%磷酸反复冲洗去掉未结合的游离同位素 ^{32}P, 80 ℃烤干后, 加入闪烁液平衡 4 h 或过夜, 于液闪测定仪上测 cpm 值。以每分钟每毫克底物蛋白(MBP)中掺入的 ^{32}P 的 pmol 数表示 ERK1 和 $p38^{MAPK}$ 活性。

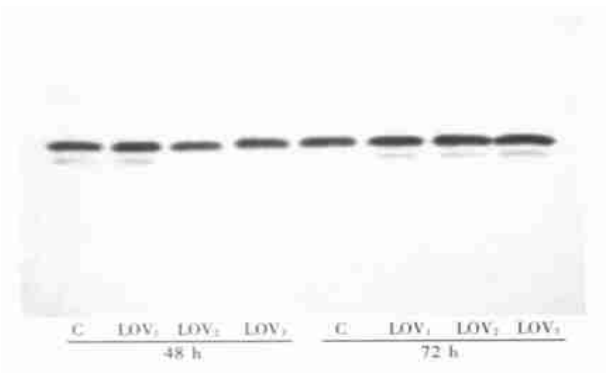
1.5 统计学处理

每项检测结果均重复 3 次, 实验数据采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 ERK1 蛋白表达水平和活性的影响

免疫印迹结果显示, LOV 处理 MCF-7 细胞各组和对照组 ERK1 蛋白表达水平无明显变化, 见图 1, 但研究同时发现, 不同剂量的 LOV 处理 48~72 h 后, 均能明显抑制 ERK1 活性($P<0.01$), 其中 LOV 16 μmol/L 组比 4、8 μmol/L 组更能显著降低 ERK1 活性($P<0.01$), 但 4 和 8 μmol/L 剂量组间 ERK1 活性变化不明显, 见表 1。提示 LOV 对 ERK1 活性的影响不是通过改变蛋白表达, 而可能主要是通过影响其蛋白磷酸化水平实现的。



C: Control; LOV_1: 4 μmol/L LOV; LOV_2: 8 μmol/L LOV; LOV_3: 16 μmol/L LOV

图 1 LOV 对 MCF-7 细胞 ERK1 蛋白表达的影响

Fig 1 Effects of LOV on the ERK1 protein expression in MCF-7 cells

表 1 LOV 对 MCF-7 细胞 ERK1 活性的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

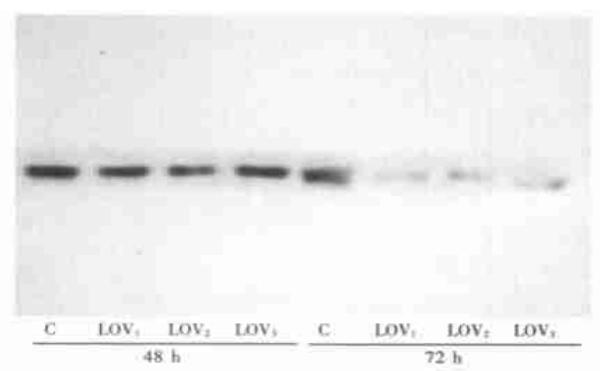
Tab 1 Effect of LOV on the ERK1 activity in MCF-7 cells($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	ERK1 activity (pmol·mg^{-1}·min^{-1})	
	48 h	72 h
Control	5.443±0.280	5.443±0.280
4 μmol/L	3.498±0.327 *	2.443±0.350 *
8 μmol/L	3.703±0.295 *	2.563±0.251 *
16 μmol/L	1.607±0.355 * #	1.840±0.240 * #

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* 4 μmol/L and 8 μmol/L groups

2.2 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平和活性的检测

LOV 以不同剂量处理 MCF-7 细胞 48 h, 各处理组 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平与对照组无明显变化; 72 h 后各处理组 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平明显低于对照组, 但不同剂量间无显著差异, 表明 LOV 处理 72 h 能明显下调 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达, 见图 2。而激酶活性检测结果显示, 不同剂量的 LOV 处理 48~72 h, 均能明显抑制 $p38^{MAPK}$ 活性($P<0.01$), 具有 ERK1 活性变化的相同趋势, 见表 2。提示 LOV 也可能主要是通过影响 $p38^{MAPK}$ 蛋白磷酸化水平调控其活性。



C: Control; LOV_1: 4 μmol/L LOV; LOV_2: 8 μmol/L LOV; LOV_3: 16 μmol/L LOV

图 2 LOV 对 MCF-7 细胞 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of LOV on the $p38^{MAPK}$ protein expression in MCF-7 cells in MCF-7 cells

表 2 LOV 对 MCF-7 细胞 $p38^{MAPK}$ 活性的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of LOV on $p38^{MAPK}$ activity in MCF-7 cells ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	$p38^{MAPK}$ activity (pmol·mg^{-1}·min^{-1})	
	48 h	72h
Control	2.572±0.105	2.572±0.105
4 μmol/L	1.905±0.122 *	1.645±0.137 *
8 μmol/L	1.796±0.162 *	1.600±0.091 *
16 μmol/L	1.000±0.016 * #	0.847±0.008 * #

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* 4 μmol/L and 8 μmol/L groups

3 讨论

研究显示 LOV 与 HMG-CoA 还原酶结合能降低胆固醇合成, 同时抑制 HMG-CoA 还原生成 MVA, 而 MVA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

途径代谢终产物为固醇类化合物、长醇、泛醌、角鲨烯及各种法呢化蛋白质等, 该途径合成受阻将影响细胞电子传递、信号传导以及细胞的终末分化等[3]。文献[4]报道 LOV 具有抗肿瘤的功效, 且毒副作用发生率低并对正常细胞影响较少。MAPK 途径是介导细胞反应的重要信号系统, MAPK 的活化能诱导大多数真核生物细胞增殖[5], 但研究显示 MAPK 活性的异常与肿瘤的发生关系密切。目前已鉴定出 ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/应激激活蛋白激酶(Stress-activated protein kinase, SAPK)、p38 和 ERK5/BMK1(Big MAP kinase 1)MAPK 亚族, 不同的 MAKP 具有不同的底物特异性, 并被不同的细胞外刺激信号所调节, 而不同 MAPK 亚族活化的差别主要位于双磷酸化位点调节区附近, 其中 MAPK 磷酸化唇结构被认为是决定各种 MAPK 激酶活性的关键部位, 在调节蛋白激酶激活或失活中起重要作用[5]。

本实验显示, 不同剂量的 LOV 处理 MCF-7 细胞 48 h 和 72 h, 各剂量组和对照组比较 ERK1 蛋白表达水平均无明显变化, 但 ERK1 活性检测却显示, 不同剂量的 LOV 均能明显抑制 ERK1 活性, 其中 LOV 16 μmol/L 组抑制 ERK1 活性最明显(与 4、8 μmol/L 组比较 $P<0.01$), 且随 LOV 处理时间的延长, 该作用越明显, 提示 LOV 对 ERK1 的影响不是通过改变该蛋白表达, 而主要通过影响其蛋白磷酸化水平来调控 ERK1 活性。Sarah 等[6]的研究也显示 LOV 不能改变 ERK1/ERK2 的蛋白水平, 却能通过下调 ERK1/ERK2 活性(即磷酸化状态)促进白血病细胞的凋亡, 同时在 HIRcB 成纤维细胞, LOV(1～30 μmol/L)作用 24 h 可抑制 60%胰岛素受体诱导的 ERK1/ERK2 活性, 而对细胞总的 MAPK 蛋白水平无影响[7]。本研究同时显示, LOV 以不同剂量处理 MCF-7 细胞 48 h, 各剂量组 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平与对照组比较无明显差异, 72 h 后各剂量组 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平明显低于对照组, 但各剂量组间无显著性差异, 而 $p38^{MAPK}$ 活性在 LOV 作用 48～72 h 均可见明显降低, 具有与 ERK1 活性相同的变化趋势, 表明 LOV 也是通过调控 $p38^{MAPK}$ 蛋白磷酸化水平而影响其活性的。上述结果还提示, 相同的处理条件能导致 ERK1 和 $p38^{MAPK}$ 蛋白表达水平大相径庭的变化, 表明 LOV 可能通过介导不同的信号通路影响 MCF-7 细胞 ERK1 和 $p38^{MAPK}$ 的磷酸化唇结构, 分别调控其活性。有研究报道, LOV 抑制胰岛素受体诱导 ERK1/ERK2 活化的作用及 LOV 阻碍碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导 MAPK 去磷酸化的过程, 均可因加入 MVA 逆转, 提示 LOV 阻碍细胞类固醇的合成能直接导致 MAPK 活性下降[7,8], 另 Sindermann 等[9]指出 LOV 还可通过抑制胞内酪氨酸激酶磷酸化(非细胞胆固醇合成途径), 下调平滑肌细胞 ERK1/ERK2 的活性, 从而推测 LOV 可能通过抑制 MCF-7 细胞胆固醇合成, 或影响胞内其他信号途径如酪氨酸激酶磷酸化水平, 下调细胞 MAPK 活性。MAPK 信号传导通路的最终目标是将外界信号传导入细胞核内, 诱导相关转录因子如 TCF、ATF-2、c-Myc、c-Jun 等磷酸化, 调节与细胞生长和分化有关基因的表达, 我们以往的研究已显示, 相同剂量的 LOV 致 MCF-7 细胞增殖受抑, 并有诱导分化的趋势(另文报道), 表明 LOV 降低 MCF-7 细胞 MAPK 活性可能还是 LOV 抑制 MCF-7 细胞增殖、诱导其分化的重要分子机制。

参考文献:

[1] Agarwal B, Halmos B, Feoktistov A S, *et al*. Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(3): 521－528.

[2] 李田昌, 庞永政, 苏静怡, 等. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定[J]. 基础医学与临床, 1996, 16(2): 78－80.

[3] 国　风, 陈子兴. 他汀类药物与细胞增殖凋亡[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27(4): 208－210.

[4] Tolman K G. The liver and lovastatin[J]. Am J Cardiol, 2002, 89(12): 1374－1380.

[5] 端木德强, 李中海, 王敬泽. MAPK 信号传导通路研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 151－155.

[6] Sarah A H, Raymond J H. Interaction of cytosine arabinoside and lovastatin in human leukemia cells[J]. Leukemia Res, 2001, 25(8): 651－660.

[7] Xu X Q, McGuire T F, Blaskovich M A, *et al*. Lovastatin inhibits the stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin in HIRcB fibroblasts[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 326(2): 233－237.

[8] Skaletz Rorowski A, Muller J G, Kroke A, *et al*. Lovastatin blocks basic fibroblast growth factor-inducecd mitogen activated protein kinase signaling in coronary smooth muscle cells *via* phophatase inhibition[J]. Eur J Cell Biol, 2001, 80(3): 207－212.

[9] Sindermann J R, Schmidt A, Breithardt G, *et al*. Lovastatin control signal transduction in vascular smooth muscle cells by modulating phosphorylation levels of mevalonate-independent pathways[J]. Basic Res Cardiol, 2001, 96(3): 283－289.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net