

文章编号:1005-6947(2005)09-0683-04

· 实验研究 ·

Bcl-2 和 Caspase-3 调控他莫昔芬诱导的 ER 阴性乳腺癌细胞凋亡

高德宗, 孙靖中, 李永刚, 邵立华, 李进涛

(山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究 Bcl-2 和 Caspase-3 在他莫昔芬 (TAM) 诱导 ER 阴性乳腺癌细胞凋亡中的调控作用。方法 在体外培养条件下,用浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 TAM 作用于雌激素受体 (ER) 阴性的 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞株 12, 24, 36, 48, 60h; 流式细胞仪检测细胞凋亡率及 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达, 荧光分光光度仪检测 Caspase-3 活性, 以及加入 Caspase-3 活性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 后凋亡百分率的变化。结果 TAM 作用 ER 阴性乳腺癌细胞后, Bcl-2 表达下调, Caspase-3 活性增强, 细胞凋亡率增加, 且有时间依赖性, 细胞凋亡在 48h 达高峰。Bcl-2 表达水平与 Caspase-3 活性变化成负相关 ($r = -0.921, P < 0.05$), 但 Bax 蛋白在药物处理前后无明显变化。加入 Ac-DEVD-CHO 后, 能阻断 Caspase-3 活化而抑制 TAM 诱导细胞凋亡。结论 TAM 通过下调 Bcl-2 表达而经线粒体途径诱导 ER 阴性乳腺癌细胞凋亡, Caspase-3 的激活在此过程中发挥重要作用。

关键词: 乳腺肿瘤/遗传学; 细胞凋亡; Bcl-2; Caspase-3

中图分类号: R737.9; Q329.25 文献标识码: A

Modulation of tamoxifen-induced apoptosis of ER-negative breast cancer cells by Bcl-2 and Caspase-3

GAO De-zong, SUN Jing-zhong, LI Yong-gang, SHAO Li-hua, LI Jin-tao

(Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of Bcl-2 and Caspase-3 in modulating apoptosis of ER-negative breast cancer cells induced by tamoxifen. **Methods** ER-negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 were treated with $10.0\ \mu\text{M}$ tamoxifen for 12, 24, 36, 48, 60 hours. The rate of cell apoptosis with or without caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO, and protein expression of Bcl-2, Bax were determined by flow cytometry, and the activity of Caspase-3 was examined with fluorophotometry. **Results** The expression of Bcl-2 was down-regulated, the activity of Caspase-3 and the rate of cell apoptosis were increased by TAM time-dependently, and the rate of apoptosis reached its peak at 48 hours. The expression of Bcl-2 was negatively correlated with activity of caspase-3. Tamoxifen, however, did not affect Bax protein expression. Ac-DEVD-CHO, a caspase-3 inhibitor, blocked the activation of caspase-3 and inhibited cell apoptosis induced by tamoxifen. **Conclusions** TAM could induce apoptosis in ER-negative breast cancer cells via mitochondria pathway by down-regulating Bcl-2 expression, and the activation of Caspase-3 might play an important role in the process of tamoxifen-induced apoptosis of ER-negative breast cancer cells.

Key words: Breast Neoplasms/genet; Apoptosis; Bcl-2; Caspase-3

CLC number: R737.9; Q329.25 **Document code:** A

他莫昔芬 (TAM) 能诱导 ER (-) 乳腺癌细胞

凋亡,但其机制尚不清楚。本文通过检测 TAM 作用后 ER 阴性乳腺癌细胞的凋亡率、Bcl-2 表达和 Caspase-3 活性变化,以探讨 TAM 诱导 ER 阴性乳腺癌细胞凋亡的机制以及它们的关系,为阐明 TAM 的抗癌机制提供理论依据。

收稿日期:2005-04-30; 修订日期:2005-07-16。

作者简介:高德宗(1972-),男,山东章丘人,山东大学齐鲁医院博士研究生,主要从事乳腺疾病基础与临床方面的研究。

通讯作者:高德宗 E-mail:gaohill100@yeah.net。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂

TAM(购自Sigma公司)以无水乙醇溶解后无菌过滤,用RPMI1640(购自Gibco公司)完全培养基稀释成所需浓度(乙醇浓度 $<1\%$), 4°C 保存。兔抗人Bcl-2及Bax一抗购自Santa Cruz公司;羊抗兔荧光标记二抗购自晶美公司;Caspase-3活性检测试剂盒及Caspase-3抑制剂AC-DEVD-CHO购自Promega公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231[ER(-)]由山东大学医学院肿瘤学实验室冻存,用含 2nmol/L 谷氨酰胺、 100U/mL 青霉素、 $100\mu\text{g/mL}$ 链霉素及 10% 小牛血清(杭州四季青公司)的RPMI1640完全培养基(Gibco,美国),在 37°C , $5\% \text{CO}_2$, 100% 湿度孵育箱中培养。当细胞长满瓶底后,用 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行试验。

1.3 实验分组

实验分对照组、实验组、抑制剂组。实验组细胞加TAM $10\mu\text{mol/L}$ 作用12,24,36,48,60h。抑制剂组加入TAM $10\mu\text{mol/L}$ 与Caspase-3特异性阻断剂Ac-DEVD-CHO共同孵育12,24,36,48,60h。对照组不加任何药物孵育12,24,36,48,60h。然后检测各组相应指标。

1.4 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡

收集 $10.0\mu\text{mol/L}$ TAM作用(加或不加Ac-DEVD-CHO)相应时间后的细胞制成单细胞悬液,

碘化丙啶(PI)染色;用Becton Dickinson公司的FACS Calibur型流式细胞仪测定凋亡率(激发波长 488nm);用随机所附软件对测量值进行分析。

1.5 FCM检测用药前后Bcl-2和Bax蛋白的变化

收集TAM作用相应时间后的细胞加入兔抗人Bcl-2及Bax一抗 37°C 孵育60min;PBS洗2次,加入FITC标记的羊抗兔IgG, 37°C 避光孵育30min;再次PBS洗2次,重新悬浮于 0.5mL PBS中上机检测蛋白表达,用随机所附软件对测量值进行分析。

1.6 Caspase-3活力测定

MDA-MB-231细胞(5×10^5 个)在TAM作用相应时间后,按照Caspase-3活性检测试剂盒说明书,检测Caspase-3活性。Caspase-3活性阻滞实验:TAM孵育同时加入Caspase-3特异性阻断剂Ac-DEVD-CHO,共育相应时间后检测Caspase-3活性。

1.7 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 t 检验及Pearson相关分析处理数据。

2 结 果

2.1 细胞凋亡

$10\mu\text{mol/L}$ TAM作用细胞后可诱导MDA-MB-231细胞凋亡,呈时间依赖性($P < 0.05$);TAM作用12h后,细胞凋亡率与对照组比无明显统计学差异;作用24h后出现明显细胞凋亡,48h达高峰,与对照组细胞比有显著性意义($P < 0.01$)。进一步延长作用时间凋亡率未进一步增加,药物作用60h后细胞凋亡率下降(附表)。

附表 $10\mu\text{mol/L}$ TAM处理对各组细胞凋亡率的影响

组别	细胞凋亡百分率(%)					
	处理时间(h)	12	24	36	48	60
对照		1.4 ± 0.5	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.8	1.4 ± 0.3
实验		1.7 ± 0.3	$3.1 \pm 0.6^{1)}$	$5.3 \pm 0.9^{1),2)}$	$7.9 \pm 1.2^{1),2)}$	$5.4 \pm 0.7^{2)}$
抑制剂		1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.6

注:1)与同组内前一时间段比 $P < 0.05$;2)与同时间段对照组比 $P < 0.01$

2.2 药物处理前后细胞Bcl-2及Bax蛋白表达的变化

TAM作用细胞12h,Bcl-2蛋白表达开始下调,且TAM诱导Bcl-2下调具有时间依赖性($P < 0.05$),36h达到最低值(图1,2)。Bcl-2表达下调

早于细胞凋亡。TAM作用超过36h后,Bcl-2表达不再进一步下调;作用48h后,Bcl-2表达水平逐渐上调。药物处理前后Bax蛋白表达水平无明显变化。

2.3 Caspase-3活性变化

TAM对细胞Caspase-3活性影响具有时间依赖性。TAM作用12h后,Caspase-3活性开始增强,36h达到高峰;与对照组细胞比,活性提高了4.5倍($P < 0.05$);超过36h后活性逐渐下降。同时

应用TAM和Ac-DEVD-CHO后,Caspase-3活性与对照组比无显著性差别(图3)。Pearson相关分析表明,实验组Bcl-2表达与实验组Caspase-3活性变化之间呈显著负相关($r = -0.921, P < 0.05$)。

图1 TAM与细胞孵育后Bcl-2表达水平变化

图2 10 μmol/L TAM作用24h后细胞Bcl-2表达下调

图3 TAM与细胞孵育后Caspase-3活性变化

3 讨论

尽管TAM对ER阳性乳腺癌细胞的作用机制了解得比较深入,但其对ER阴性乳腺癌细胞的作用机制尚不清楚。近几年研究发现,TAM除了对细胞增殖有影响外,还有明显的促凋亡作用,后者不仅对ER阳性的乳腺癌细胞有作用,而且对ER(-)乳腺癌细胞,甚至其他肿瘤细胞如肝癌、卵巢癌、胰腺癌等细胞亦有作用^[1]。另有研究^[2,3]表明:许多药物是通过诱导乳腺癌细胞凋亡发挥抗癌作用。

Salami等^[4]研究发现,TAM能诱导乳腺癌细胞凋亡,诱导ER阳性癌细胞凋亡所需的剂量较小,而诱导ER阴性癌细胞凋亡所需剂量较大。本研究发现,10 μmol/L TAM对ER(-)乳腺癌细胞具有诱导凋亡的作用,且有时间依赖性。TAM作用48h诱导细胞凋亡的能力达到高峰。为了进一步探讨TAM诱导MDA-MB-231细胞凋亡的机制,本研究用流式细胞仪检测了药物处理前后相关凋亡蛋白的表达变化。研究^[5]表明,乳腺癌细胞凋亡与bcl-2表达成反比。Zhang等^[6]发现,TAM诱导MCF-7乳腺癌细胞凋亡与bcl-2下调有关,而与bax,bcl-X(L)和p53无关。本实验中,10 μmol/L TAM作用36h,Bcl-2下调达到最低值,但Bax表达

无明显变化,即使增加药物作用时间也未见其有明显变化。Bcl-2在化疗药物、放射线、生长因子去除等因素诱导的肿瘤细胞凋亡中起重要作用^[7,8]。在线粒体凋亡途径中,Bax/Bcl-2比率变化影响线粒体膜的通透性,比值增大使线粒体膜通透性加大,引起细胞色素C的释放,激活Caspase-9,最后激活Caspase-3,使细胞发生凋亡^[9]。但本研究发现,尽管Bax表达无明显变化,仅仅bcl-2蛋白的变化便足以改变Bax/Bcl-2比率,从而引起细胞凋亡^[6]。

Caspase-3在Caspase家族中处于最后效应阶段,是引发细胞凋亡蛋白酶级联反应的核心蛋白酶;活化后的Caspase-3破坏核纤层,激活核酸内切酶,促进形成凋亡小体,它在细胞凋亡中起重要作用^[10]。Salami等^[4]认为,TAM诱导ER阴性乳腺癌细胞凋亡的机制是上调Caspase-3表达。为了证实TAM诱导MDA-MB-231细胞凋亡过程中Caspase-3是否发挥作用,本研究用Caspase-3荧光检测试剂盒检测药物处理前后细胞Caspase-3活性变化。结果表明:与药物诱导的Bcl-2下调一致,Caspase-3在TAM诱导的MDA-MB-231细胞凋亡中活性升高,其活性变化依赖于作用时间;10 μmol/L TAM作用36h后,Caspase-3活性达到高峰,较对照组高

4.5 倍。Ac-DEVD-CHO 能完全阻断 Caspase-3 活性,并且发现,同时应用 Ac-DEVD-CHO 后,TAM 诱导细胞凋亡的作用被抑制。

本实验阐明了 TAM 诱导 ER 阴性 MDA-MB-231 乳腺癌细胞凋亡的作用机制:TAM 下调 Bcl-2 表达,改变了 Bax/Bcl-2 比率,通过线粒体途径进一步激活 Caspase-3,从而诱导细胞凋亡。本实验还发现,Bcl-2 表达水平与 Caspase-3 活性变化成显著负相关。这说明 Bcl-2 下调后,对细胞凋亡的抑制作用减弱,线粒体释放细胞色素 C,Caspase 级联激活,最后激活 Caspase-3 导致细胞凋亡。本研究为临床应用 TAM 治疗 ER 阴性乳腺癌提供了某些理论依据。但诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的 TAM 浓度至少为 $10 \mu\text{mol/L}$,远大于临床常用剂量($0.5 \sim 1.0 \mu\text{mol/L}$),因此为了降低 TAM 用量、减少其副作用,有必要寻求与 TAM 有协同抗癌作用的药物,两者联用以发挥协同作用,降低副反应。

参考文献:

- [1] Carthew P, Nolan B M, Edwards R E, *et al.* The role of cell death and cell proliferation in the promotion of rat liver tumours by tamoxifen [J]. *Cancer Lett*, 1996, 106 (2): 163 - 169.
- [2] 刘大川,姚榛祥,李非,等. Cyclin D1 表达与雌激素受体阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s 凋亡的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11 (6): 353 - 356.
- [3] 张军初,张伟,朱大乔,等. 维生素 E 琥珀酸酯联合化疗药物对乳腺癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (4): 253 - 256.
- [4] Salami S, Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines [J]. *Clin Biochem*, 2003, 36 (4): 247 - 253.
- [5] Mustonen M, Raunio H, Paakko P, *et al.* The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions [J]. *Histopathology*, 1997, 31 (4): 347 - 354.
- [6] Zhang G J, Kimijima I, Onda M, *et al.* Tamoxifen-induced Apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without alteration of p53 protein levels [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5 (10): 2971 - 2977.
- [7] Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line [J]. *Blood*, 1993, 81 (1): 151 - 157.
- [8] Jaattela M, Benedict M, Tewari M, *et al.* Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 1995, 10 (12): 2297 - 2230.
- [9] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1309 - 1312.
- [10] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1312 - 1316.