

The Effect of the PD98059 on H₂O₂ Induced Apoptosis and Associated Proteins of Human Breast Cancer Cells

Qianmei Zhou, Shibing Su*

Research Center for Traditional Chinese Medicine Complexity System, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

Email: tazhou@163.com; shibingsu@yahoo.com

Received: Sep. 17th, 2011; revised: Sep. 28th, 2011; accepted: Sep. 29th, 2011.

Abstract: Objective: to study the effect of MEK inhibitor of PD98059 on apoptosis induced by H₂O₂ and its mechanisms in human breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** H₂O₂ inducing apoptosis in MCF-7 cells was set to observe apoptosis and its associated proteins treated in the present or absent of PD98059. The cellular morphology was investigated by AO staining. Apoptosis ratio was analyzed by flow cytometry. The expressions of p53, PCNA, caspase-3, caspase-9 and Bcl-2 were observed using Western blot analysis. **Results:** apoptosis was observed with cells treated H₂O₂ for 4 or 12 h while the degree of apoptosis was greatly decreased by 4% or 14% in MCF-7 cells treated with H₂O₂ and PD98059 together. There was significantly difference between with the treatment of H₂O₂ and PD98059 in the presence of H₂O₂ for 12 h ($P < 0.05$). The increased p53, activated caspase-3 and caspase-9 and decreased Bcl-2 were appeared with H₂O₂ treatment. However, the levels of p53 and PCNA were downregulated, the extent of caspase-3 and caspase-9 activation was decreased, and the level of Bcl-2 was upregulated in MCF-7 cells treated with PD98059 in the presence of H₂O₂. **Conclusions:** MEK inhibitor of PD98059 inhibited apoptosis by downregulating the levels of p53 and PCNA, decreasing the activation of caspase-3 and caspase-9 and upregulating the level of Bcl-2 in MCF-7 cells.

Keywords: PD98059; MEK; MCF-7; Apoptosis

PD98059 对 H₂O₂ 诱导的人乳腺癌细胞凋亡及相关蛋白的影响

周钱梅, 苏式兵*

上海中医药大学中医复杂系统研究中心, 上海

Email: tazhou@163.com; shibingsu@yahoo.com

收稿日期: 2011 年 9 月 17 日; 修回日期: 2011 年 9 月 28 日; 录用日期: 2011 年 9 月 29 日

摘要: 目的: 探讨细胞外信号调节激酶的上游激酶(MEK)抑制剂 PD98059 对 H₂O₂ 诱导的人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法:** H₂O₂ 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡, PD98059 干预其细胞凋亡。荧光染料吖啶橙(AO)观察细胞凋亡的形态学变化; 流式细胞术法进行凋亡细胞计数; Western blot 法检测 p53, PCNA, caspase-3、caspase-9 和 Bcl-2 的表达。**结果:** H₂O₂ 刺激细胞 4 h、12 h, 明显诱导了 MCF-7 细胞凋亡。PD98059 将 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡率分别降低了约 4%、14%, 与 H₂O₂ 刺激细胞 12 h 比较, 具有显著的统计学差异($P < 0.05$)。H₂O₂ 显著提高了 p53 蛋白的表达, 激活了 caspase-3 与 caspase-9 蛋白, 降低了 Bcl-2 的表达, 而 PD98059 逆转了 H₂O₂ 的刺激效应, 下调了 H₂O₂ 导致的 p53 与 PCNA 蛋白表达, 降低了 caspase-3 与 caspase-9 蛋白活性, 上调了 Bcl-2 蛋白表达。**结论:** MEK 抑制剂 PD98059 抑制了 H₂O₂ 诱导的 MCF-7 细胞凋亡, 其作用机制与其降低了 p53 和 PCNA 蛋白表达和 caspase-3 与 caspase-9 蛋白活性以及增加 Bcl-2 蛋白表达有关。

关键词: PD98059; MEK; MCF-7; 细胞凋亡

1. 引言

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, 参与多种细胞功能的调控, 尤其是在细胞增殖、分化与凋亡中, 起着关键作用^[1]。各种生长因子及细胞因子的信号传递大多通过 MAPK 信号通路来进行^[2,3]。细胞外信号调节激酶的上游激酶(MEK)是其中重要的一环, 具有酪、苏氨酸激酶活性, 通过活化其下游的细胞外信号调节激酶(ERK), 调节相关蛋白的表达, 影响细胞的增殖、分化及凋亡。本文拟运用 MEK 特异性抑制剂 PD98059 探讨其对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响, 及其对相关蛋白的调节。

2. 材料与方法

2.1. 主要材料

MCF-7 细胞由中国科学院健康所荆清课题组惠赠。PD98059 购自美国 Biomol 公司。H₂O₂ 购自美国 sigma 公司。RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司。胎牛血清(FBS)购自美国 PAA 公司。牛胰岛素(Insulin)购自 Sigma 公司。p53(FL-393)、PCNA 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

2.2. 方法

2.2.1. 溶液的配制

以少量二甲亚砜(DMSO)溶解 PD98059 粉末, 配制成 6.5 mg/ml 溶液(储存液), 分装置-20℃避光保存, 临用时稀释成所需浓度(DMSO 终浓度 < 0.1%)。H₂O₂ 以去离子水溶解, 配制成 10 mmol/L 溶液(储存液), 置 4℃避光保存。

2.2.2. 细胞培养

MCF-7 细胞种植在 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS, 0.01 mg/ml Insulin, 100 U/ml 青链霉素混合液, 20 mmol/L HEPES)中, 细胞在 37℃ 5% CO₂ 环境中单层生长。

2.2.3. 荧光染料吖啶橙(AO)的细胞形态学观察

取对数生长期的乳腺癌 MCF-7 细胞, 接种于 60 mm 培养皿中。24 h 后加入终浓度为 200 μmol/L

H₂O₂ 预处理细胞 2 h 后换新鲜培养液, 再加入终浓度为 80 μmol/L PD98059, 分别于 4 h、12 h 后收集细胞, 同时设同样条件下单独应用 200 μmol/L H₂O₂、80 μmol/L PD98059 及未经药物处理的空白对照组。PBS 液洗涤 2 遍, 制成活细胞悬液, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶/ml, 取 95 μl 细胞悬液与 5 μl 吖啶橙溶液(100 μg/ml)混匀, 吸 1 滴混合液点于洁净玻片上, 直接用盖玻片封片, 荧光显微镜观察, 摄片。

2.2.4. 流式细胞仪的检测

取对数生长期的乳腺癌 MCF-7 细胞, 细胞处理同 2.2.3 中描述。适时观察, 收集细胞, 以不含 EDTA 的 0.25% 的胰酶进行消化。冷 PBS 洗细胞 2 次。将细胞转移至 1.5 ml 的离心管中。将对照组的细胞分为 4 管, 每管中细胞浓度约 1 × 10⁶/ml。每管以 400 μl 1 × 结合缓冲液悬浮。其中, 一管为空白对照、一管为 Annexin V 单染、一管为 PI 单染、一管为 Annexin V 和 PI 双染。染色法为加 5 μl Annexin V-FITC, 轻轻振荡混匀, 4℃避光染色 15 min。加 10 μl PI 染液, 混匀, 4℃避光染色 5 min。药物处理过的细胞, 以 400 μl 1 × 结合缓冲液悬浮, 再进行双染, 上流式细胞仪进行。具体实验操作按照 CELL LAB Aposcreen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit 试剂盒(BECKMAN COULTER)进行。

2.2.5. Western 免疫印迹

提取对照组和用药干预后的细胞总蛋白, Bradford 法定量后制备 western 上样样品, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后, 剪取与凝胶大小一致的 PVDF 膜及滤纸, 浸于 Transfer buffer 中 10 min, 按下列顺序放置于 Bio-Rad 半干电转移装置上: 正极 → 滤纸 → PVDF 膜 → 凝胶 → 滤纸 → 负极, 15 V 稳压转移 30 min。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 弃去封闭液, 加入一抗(用 TBST 稀释), 4℃反应过夜。次日, 洗膜后加入二抗, 室温反应 1 h, 洗膜后加入 ECL 显色液, 读片。

2.2.6. 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两均数的比较用 *t* 检验, *P* < 0.05, 表示具有显著的统计学意义。

3. 结果

3.1. H₂O₂ 及 PD98059 干预后细胞形态学变化及其诱导的细胞凋亡率

AO 荧光染色对细胞凋亡的形态学观察实验结果如图 1 所示, 正常细胞核结构正常、均呈绿色荧光(图 1(A)), 200 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 4 h、12 h 后, 荧光显微镜下观察到典型的细胞凋亡特征性变化, 凋亡细胞核呈固缩状的或半月形绿色荧光或橘黄色荧光(图 1(B, E)), 与经 H₂O₂ 处理组比较, 80 μmol/L PD98059 干预细胞 4 h、12 h 后, 凋亡细胞减少。流式细胞仪检测的细胞凋亡率如图 2 所示, H₂O₂ 刺激细胞 4 h、12 h, 诱导的细胞凋亡率分别为 19.59%、25.98%, 而 PD98059 将其凋亡率分别降低了约 4%、14%, 与 H₂O₂ 刺激细胞 12 h 比较, 具有显著的统计学差异($P < 0.05$)。

3.2. PD98059 对 p53、PCNA 蛋白表达的影响

对 p53、PCNA 蛋白的实验结果如图 3 所示, 与未经 H₂O₂ 及 PD98059 处理的对照组比较, 200 μmol/L H₂O₂ 处理细胞 4 h、12 h 后明显诱导了 p53 蛋白的表达, 而 80 μmol/L PD98059 下调了经 H₂O₂ 刺激的 MCF-7 细胞中 p53 蛋白表达, PD98059 单独运用 12h 则完全抑制了 p53 蛋白的表达。与未经 H₂O₂ 及 PD98059 处理的对照组比较, 单独运用 PD98059 抑制了 PCNA 的表达, 而其余各组均未明显变化。

3.3. PD98059 对 caspase-3, caspase-9 及 Bcl-2 蛋白的影响

200 μmol/L H₂O₂ 刺激 MCF-7 细胞 4 h、12 h 均激活了 caspase-3 与 caspase-9 的活性, 降低了 Bcl-2 的表达。80 μmol/L PD98059 降低了经 200 μmol/L H₂O₂ 刺激下的 MCF-7 细胞中 caspase-3 与 caspase-9 的活性, 增加了该细胞中 Bcl-2 蛋白的表达。单独运用 PD98059 干预细胞 12 h 则完全抑制了 caspase-3 与 caspase-9 的活性, 增加了 Bcl-2 蛋白的表达(图 4)。

4. 讨论

乳腺癌的发生发展涉及到一系列信号转导分子活性的改变。研究表明, 丝裂原活化蛋白激酶通路之一

的细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导途径在乳腺癌的发生和发展中起着重要的作用。信号转导通路的异常活化能够导致细胞丧失凋亡和分化的能力, 促使细胞恶性转化, 异常增殖, 产生肿瘤, 并能进一步促进肿瘤细胞的增殖^[4]。从 H₂O₂ 介导细胞凋亡的机制来看, H₂O₂ 主要损伤细胞的膜性结构, 暴露出来的膜结构成份磷脂酰丝氨酸(PS)^[5], 是吞噬细胞识别和吞噬凋亡细胞的靶点。因此 H₂O₂ 作为 ROS 族被认为是诱导细胞凋亡的重要因素, 可作为细胞内信号转导分子参与细胞凋亡的发生^[6,7]。本研究探讨 MEK 特异性抑制剂 PD98059 对 H₂O₂ 诱导的乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响及其作用机理。

p53 是重要的肿瘤抑制因子, p53 通过参与细胞内的信号转导通路, 调节细胞的正常生命活动, 包括细胞周期, 细胞增殖, 细胞凋亡等^[8]。p53 与细胞凋亡的调控密切相关^[9], 野生型 p53 的功能象“分子警察”监控着细胞基因组的完整性, 如果细胞 DNA 受损, p53 基因产物累积, 诱导细胞进入 G1 静止期, 启动修复系统进行修复。若修复失败, p53 基因产物可诱导凋亡来触发细胞死亡。p53 蛋白作为转录因子, 通过阻止细胞复制和发动细胞凋亡——保持基因的稳定性, 维持细胞正常生长, 抑制恶性增殖, 对细胞生长起负调节作用。

PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助蛋白, 是细胞周期所必需的物质, 又称周期蛋白。PCNA 在细胞增殖调控上起着促进 DNA 合成的重要作用, 是评价细胞增殖状态的客观指标^[10]。研究表明^[11], 正常乳腺组织中 PCNA 表达率较低, 随不典型增生的加重表达率增高。众所周知, 野生型 p53 可抑制肿瘤的发生, 而 p53 基因突变或缺失与多种肿瘤的发生密切相关。当 p53 基因突变时, 就失去了对细胞生长繁殖调控的功能, 使细胞通过 G1 期进入 S 期, 导致 PCNA 高表达。可见 p53 蛋白的失活, 对增殖细胞核抗原 PCNA 的调控作用明显减弱, 使其表达增强, 乳腺癌细胞趋向于大量增殖^[12]。

本研究用 200 μmol/L H₂O₂ 刺激细胞, 诱导了细胞凋亡, 同时诱导了细胞中 p53 蛋白的表达, 这与先前的研究结果一致^[13,14]。实验结果显示, H₂O₂ 刺激

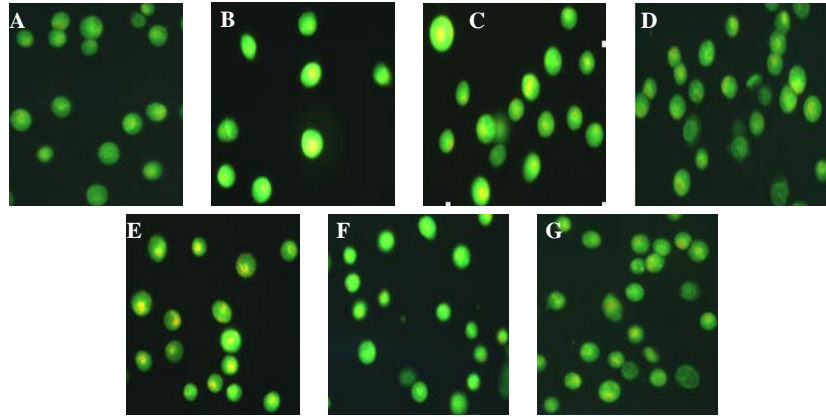


Figure 1. The cellular morphology was investigated in MCF-7 cells treated both H₂O₂ and PD98059 alone or together for 4 and 12 h. (A) Treatment without both H₂O₂ and PD98059 (×400); (B) Treatment with H₂O₂ for 4 h (×400); (C) Treatment with H₂O₂ and PD98059 for 4 h (×400); (D) Treatment with PD98059 for 4 h (×400); (E) Treatment with H₂O₂ for 12 h (×400); (F) Treatment with H₂O₂ and PD98059 for 12 h (×400); (G) Treatment with PD98059 for 12 h (×400). Results are from 3 independent experiments

图 1. PD98059 对 H₂O₂ 分别于 4 h、12 h 刺激的 MCF-7 细胞中细胞形态学变化。(A) 未经 H₂O₂ 及 PD98059 处理的对照组(×400); (B) H₂O₂ 处理细胞 4 h(×400); (C) H₂O₂ + PD98059 干预细胞 4 h(×400); (D) PD98059 干预细胞 4 h(×400); (E) H₂O₂ 处理细胞 12 h(×400); (F) H₂O₂ + PD98059 干预细胞 12 h(×400); (G) PD98059 干预细胞 12 h(×400)。实验结果重复 3 次

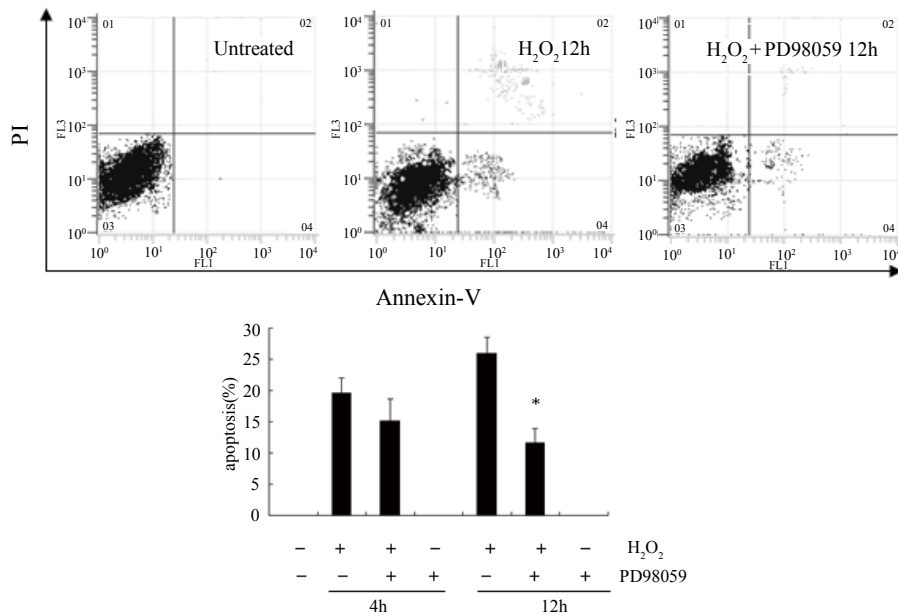


Figure 2. Apoptosis was observed in MCF-7 cells treated with both H₂O₂ and PD98059 alone or together for 4 h and 12 h. *, *P* < 0.05, compared with H₂O₂ 12 h. Values are means ± SE from 3 independent experiments

图 2. PD98059 对 H₂O₂ 分别于 4 h、12 h 刺激的 MCF-7 细胞中细胞凋亡率的影响。*, *P* < 0.05, 与 H₂O₂ 刺激 MCF-7 细胞 12 h 比较。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 (*n* = 3)

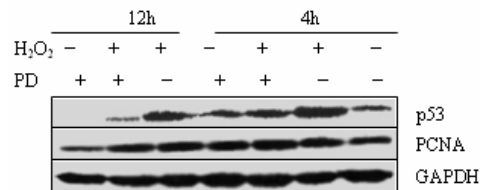


Figure 3. The levels of p53 and PCNA were observed in MCF-7 cells treated with both H₂O₂ and PD98059 alone or together for 4 h and 12 h. Results are from 3 independent experiments

图 3. PD98059 对 H₂O₂ 分别于 4 h、12 h 刺激的 MCF-7 细胞中 p53 和 PCNA 蛋白的影响, 实验结果重复 3 次

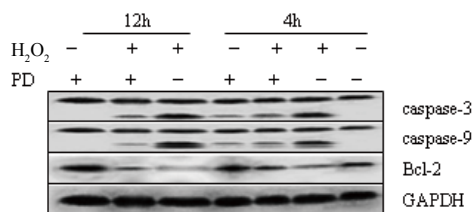


Figure 4. Apoptosis related-proteins caspase-3, caspase-9 and Bcl-2 were observed in MCF-7 cells treated with both H₂O₂ and PD98059 alone or together for 4 h and 12 h. Results are from 3 independent experiments

图 4. PD98059 对 H₂O₂ 分别于 4 h、12 h 刺激的 MCF-7 细胞中凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 与 Bcl-2 的影响, 实验结果重复 3 次

MCF-7 细胞 4 h、12 h 均可诱导细胞凋亡, 且刺激了 MCF-7 细胞中 p53 的高表达, 当其与 PD98059 联合应用时, 下调了 p53 的表达。且当单独运用 PD98059 时 p53 的表达被抑制的更明显, PD98059 干预细胞 12 h 时则完全抑制了 MCF-7 细胞中 p53 的表达。这可能与 H₂O₂ 的氧化应激反应诱导了 p53 介导的细胞凋亡, 而 PD98059 对其起到了抑制作用有关。同时, PD98059 干预细胞 12 h 时下调了 PCNA 的表达, 而其他各组均未明显影响 PCNA 的表达, 这可能与 PD98059 抑制细胞增殖有关, 其具体的作用机制有待进一步研究。

细胞凋亡从内外多因子复杂的相互作用诱导产生凋亡信号, 传递至 caspase 并使其活化开始, 以蛋白底物裂解、细胞解体为结局, 从而使细胞凋亡得以完成。线粒体释放的细胞色素 C 能与 Apaf-1 及 caspase-9 形成一个复合物, 在 dATP、ATP 存在下活化 caspase-3、caspase-6、caspase-7 等成员, 使凋亡进行下去^[15]。细胞凋亡受各种内外信号的影响调控, 或抑制或诱导细胞凋亡, Bcl-2 是凋亡研究中最受重视的癌基因之一。有研究表明 caspase-3 能裂解 Bcl-2 蛋白, 在体外从过表达 caspase-3 的细胞中发现 Fas 配体诱导细胞凋亡时, caspase 能在 Bcl-2 蛋白环状区域的 Asp34 处裂解 Bcl-2 蛋白。

本研究发现, 经 H₂O₂ 刺激的 MCF-7 激活了 caspase-3 与 caspase-9 蛋白, 下调了 Bcl-2 的表达, 而 PD98059 则降低了 H₂O₂ 的效应, 即 PD98059 降低了 caspase-3 与 caspase-9 的活性, 提高了 Bcl-2 蛋白的表达。可见, H₂O₂ 通过 caspase-3、caspase-9 及 Bcl-2 途径诱导的细胞凋亡被 PD98059 阻断。

5. 结论

综上所述, 本研究证实了 H₂O₂ 可诱导细胞凋亡, 同时可刺激细胞中凋亡相关蛋白 p53 的高表达, 激活

caspase-3 与 caspase-9 蛋白, 降低 Bcl-2 水平。MEK 特异性抑制剂 PD98059 则抑制了细胞凋亡, 同时抑制了细胞中 p53 的表达, 且其下调了细胞中 PCNA 的表达, 降低了 caspase-3 与 caspase-9 的活性, 提高了 Bcl-2 蛋白的表达。提示在人乳腺癌 MCF-7 细胞中 p53、PCNA 及其凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-9 与 Bcl-2 的表达可能与 MEK 通路有关。

6. 致谢

感谢上海市教委 E-研究院中医内科建设计划资助项目(E03008)、上海市教委预算内科研项目(2010JW28)给予的资助。

参考文献 (References)

- [1] R. Seger, E. G. Krebs. The MAPK signaling cascade. The FASEB Journal, 1995, 9(9): 726-735.
- [2] G. Piwien-Pilipuk, J. S. Huo and J. Schwartz. Growth hormone signal transduction. Journal of Pediatric and Endocrinology & Metabolism, 2002, 15(6): 771-786.
- [3] C. R. Weinstein-Oppenheimer, W. L. Blalock, L. S. Steelman, et al. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. Pharmacology & Therapeutics, 2000, 88(3): 229-279.
- [4] A. Adeyinka, Y. Nui, T. Cherlet, et al. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. Clinical Cancer Research, 2002, 8(6): 1747-53.
- [5] 李立平, 韦瑛, 蔡捷等. 过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡与 Caspase-3 表达的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(8): 960-961.
- [6] Y. K. Wang, Y. J. Hong, M. Wei, et al. Curculigoside attenuates human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(1): 233-239.
- [7] P. M. Siu, Y. Wang and S. E. Alway. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C₂C₁₂ myotubes. Life Science, 2009, 84(13-14): 468-481.
- [8] E. E. Balint, K. H. Vousden. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. British Journal of Cancer, 2001, 85(12): 1813-1823.
- [9] G. Fontanini, L. Boldrini, A. Calcinali, et al. Thrombospondins and messenger RNA expression in breast cancer: Relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. Clinical Cancer Research, 1999, 5(3): 156.
- [10] 虞卫新, 徐群, 李新忠. 乳腺癌增殖细胞核抗原表达及其临

- 床意义[J]. 江苏大学学报(医学版), 2005, 15(5): 418-419.
- [11] 魏艳华. 乳腺良恶性病变中 PCNA 表达及其意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2000, 5(2): 116-117.
- [12] 梁惠琪, 周仲文, 丁俊杰等. 乳腺癌组织中抗凋亡基因 survivin、p53 和 PCNA 蛋白的表达及其相关性的探讨[J]. 复旦学报(医学版), 2004, 31(6): 629-631.
- [13] G. W. Verhaegh, M. J. Richard and P. Hainaut. Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: Dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(10): 5699-5706.
- [14] S. Zhuang, Y. Yan, R. A. Daubert, et al. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2007, 292(1): F440-F447.
- [15] X. Luo, I. Bndihardjo, H. Zou, et al. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94(4): 481-490.