

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.13.011

DNALK5 抑制乳腺癌增殖的分子机制研究

方娟, 李文鲜, 黄小兰

(重庆市渝北区人民医院检验科, 重庆 401120)

摘要:目的 探讨显性负性突变 ALK5(DNALK5)是否可通过抑制转化生长因子- β (TGF- β)/SMAD 信号通路来抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖。方法 采用荧光定量 PCR 检测乳腺癌细胞中 ALK5 受体表达;通过流式细胞术和 MTT 检测 DNALK5 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 增殖和周期的改变;采用 western blot 检测 DNALK5 感染 MDA-MB-231 后对乳腺癌细胞中 TGF- β /SMAD 信号通路中 SMAD2/3 总蛋白和磷酸化蛋白表达及其下游靶基因 ID1 表达的影响。结果 乳腺癌细胞系中存在 ALK5 的普遍表达,其中 MDA-MB-231 表达最高;DNALK5 腺病毒感染 MDA-MB-231 后,MTT 显示第 3 天 DNALK5 组细胞吸光度值(0.35 ± 0.04)显著低于 RFP 组(0.58 ± 0.06),流式细胞术显示其周期阻滞于 G₀ 期;荧光定量 PCR 和 western blot 显示 ID1 和 CyclinD1 表达降低,进一步研究发现 TGF- β /SMAD 信号通路中关键蛋白 SMAD2/3 磷酸化蛋白表达降低。结论 DNALK5 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 增殖,可通过抑制 TGF- β /SMAD 信号通路的激活,下调肿瘤增殖相关基因 ID1 和 CyclinD1 表达来实现。

关键词:显性负性突变; ALK5; 转化生长因子- β ; SMAD; 乳腺癌; 增殖

中图法分类号:R737.9;R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)13-1903-04

Research the molecular mechanism of DNALK5 inhibits the proliferation of breast cancer

FANG Juan, LI Wenxian, HUANG Xiaolan

(Department of Clinical Laboratory, Yubei People's Hospital, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To investigate whether dominant negative mutation ALK5 can inhibit the proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-231 by inhibiting the TGF- β /SMAD signaling pathway. **Methods** The expression of ALK5 in breast cancer cells was detected by fluorescence quantitative PCR. The change of proliferation and cycle of breast cancer cells were determined by MTT assay and flow cytometry. The expression of ID1, phosphorylation protein and total protein of SMAD2/3 on TGF- β /SMAD signaling pathway were detected by the western blot while MDA-MB-231 cells were infected with Adenovirus dominant negative ALK5. **Results** The results showed that ALK5 mRNA was detected in all kinds of breast cancer cells and the the highest expression breast cancer cell was MDA-MB-231; MTT and flow cytometry showed the absorbance of DNALK5 group cell (0.35 ± 0.04) was significantly lower than RFP group (0.58 ± 0.06) and cell cycle was blocked in G₀ stage after Ad DNALK5 infection 3 days. The expression of mRNA and protein of ID1 and CyclinD1 were decreased, by real time PCR and western blot, further study found that SMAD2/3 phosphorylation protein on TGF- β /SMAD signaling pathway were reduced. **Conclusion** DNALK5 can inhibit the proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-231 through down regulation ID1 and CyclinD1 expression and inhibit the activation of TGF- β /SMAD signaling pathway.

Key words: dominant negative mutation; ALK5; transforming growth factor- β ; SMAD; breast cancer; tumor proliferation

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,占女性肿瘤的第一位,全世界乳腺癌的发病率呈现逐年升高趋势^[1]。临床放化疗、靶向分子治疗、生物治疗在一定程度上提高了乳腺癌的治疗效果,大大提高了患者生活质量和生存期,但临床的三阴性[雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和原癌基因 Her-2 均为阴性]乳腺癌的治疗效果往往不佳,无有效的治疗手段,严重影响患者的预后^[2-5]。

临床三阴性乳腺癌患者约占所有乳腺癌患者的 20%。三阴性乳腺癌恶性程度高,侵袭转移能力强,患者预后往往不良,死亡风险很高。在传统的放、化疗等治疗手段效果不好的情况下,乳腺癌的生物基因治疗可能是最有效的手段。文献报道转化生长因子- β (TGF- β)/SMAD2/3 信号通路在乳腺癌中处于激活状态,TGF- β 信号通路的激活是乳腺癌生长、侵袭、转移的一个重要原因^[6]。因此抑制其信号通路的激活,

可抑制乳腺癌的生长、侵袭、转移过程。ALK5 作为 TGF- β /SMAD 信号通路中重要的受体,阻断 ALK5 可有效抑制 TGF- β /SMAD 信号通路的激活,从而抑制乳腺癌生长、侵袭、转移^[7-10]。本课题研究显性阴性突变 ALK5 (DNALK5) 受体对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖能力的影响,以及可能涉及作用的靶基因,为实现 ALK5 基因治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和腺病毒载体 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 T47D 细胞、乳腺癌 ZR-75-3 细胞、乳腺癌 SK-BR-3 细胞、乳腺癌 MD-MB-453 细胞、MD-MB-468 细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供, DNALK5 腺病毒、RFP 腺病毒由本室构建,并保存。

1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养液(美国 Life 公司);胎牛血清(美国 Corning 公司);RNAiso plus、反转录试剂、荧光定量 PCR 试剂(大连宝生生物技术公司);MTT 检测试剂(美国 Sigma 公司);PCR 引物(南京金斯瑞物生物技术有限公司);蛋白质提取裂解液和 western blot 检测试剂(上海碧云天生物技术有限公司);ECL 化学发光试剂盒(北京英格恩生物技术有限公司);鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(#3700)和兔抗人 SMAD2/3(#8685)购自美国 Cell Signaling 公司;兔抗人 p-SMAD2/3 多克隆抗体(ab63399)、鼠抗人 ID1 单克隆抗体(ab66495)和兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体(ab134175) 购自美国 Abcam 公司。

1.3 荧光定量 PCR 引物的设计 登录 PubMed 找到基因的相关序列,将基因序列输入 Premier 5 引物设计软件,得到相应引物,选择评分最高者,并进行 BLAST 引物比对,确保引物的特异性,具体引物如下: ALK5 上游引物 5'-AGAGCTGTGAAGCCTT-GAAGA-3',下游引物 5'-TGATGCCTTCCTTGT-TGACTG-3';GAPDH 上游引物 5'-CAGCGACAC-CCACTCCTC-3',下游引物 5'-TGAGGTCCACCAC-CCTGT-3';ID1 上游引物 5'-CTCTACGACATGAACG-GCTGT-3',下游引物 5'-TGCTCACCTTGCGGT-TCTG-3';CyclinD1 上游引物 5'-AACACATCATC-CCCAAACAC-3',下游引物 5'-TCACACTTCAT-CACTCTGGA-3'。

1.4 细胞培养与实验分组 乳腺癌 MCF7 细胞、乳腺癌 T47D 细胞、乳腺癌 ZR-75-3 细胞、SK-BR-3 细胞、乳腺癌 MDA-MB-231 采用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液于 37℃、5% CO₂ 培养,乳腺癌 MD-MB-453 细胞、MD-MB-468 细胞采用 10% 胎牛血清的 L15 培养液培养,无 CO₂。乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长到 70%~80% 密度时,用胰酶(0.25%)消化、传代,继续培养,实验分为 3 组,空白对照组(MDA-MB-231 组),实验对照组 RFP 腺病毒感染 MDA-MB-231(RFP 组),实验组 DNALK5 腺病毒感染

MDA-MB-231(AdDNALK5 组),其中 RFP 组和 DNALK5 组的腺病毒感染效率保持一致,感染率约为 70%。

1.5 荧光定量 PCR 检测 ALK5 受体在 MDA-MB-231 中表达 用 RNAiso plus 提取各乳腺癌细胞系及 MDA-MB-231 各组细胞 RNA,反转录成 cDNA,并以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应,检测各乳腺癌细胞系 ALK5 基因的表达。PCR 扩增条件:预变性 98℃ 10 s;变性 98℃ 10 s,退火 58℃ 30 s,共 40 个循环,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示基因的相对表达量。

1.6 MTT 检测细胞增殖改变 1×10^5 个/mL 的细胞密度,按 100 μ L 每孔细胞悬液接种于 96 孔板,每组设平行孔 5 个。细胞贴壁 12 h 后,将 DNALK5 腺病毒和 RFP 腺病毒分别感染 MDA-MB-231,病毒感染 8 h 更换为含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液,病毒感染 24 h 后开始用 MTT 试剂检测各孔细胞的吸光度值,整个实验连续监测 5 d,并根据吸光度值绘制其增殖曲线图。

1.7 western blot 检测 DNALK5 对 TGF- β /SMAD 信号通路改变 MDA-MB-231 接种于直径 10 cm 培养皿,待细胞密度达到 50%~60% 时,分别加入 DNALK5 和 RFP 腺病毒,8 h 后换成 1% 胎牛血清的 L15 培养液,继续培养 48 h,用预冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗两次,加入 1 mL PBS 于培养皿中,用细胞刮将细胞全部刮下,并收集于 1.5 mL EP 管中,800 $\times$ g 离心 5 min 后,倒掉上清液,加入 250 μ L RIPA 阿联可冰上裂解细胞,30 min。4℃,12 000 r/min 离心 15 min,转移上清液至 1.5 mL EP 管中,BCA 法检测蛋白水平。取 20 μ L 细胞蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶 5%,分离胶 10%),湿转 PVDF 膜,5% 牛血清清蛋白 37℃ 封闭 1 h,滴加相应一抗 4℃ 孵育过夜,然后用 TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次,滴加相应的二抗于室温孵育 1 h, TBST 洗膜 15 min $\times$ 3 次,最后加入 ECL 显色液在 GEL EQ 上成像。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 20.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALK5 在乳腺癌细胞系中表达 荧光定量 PCR 法检测 ALK5 在转移能力不同的乳腺癌细胞系中表达,发现 ALK5 在恶性程度最高的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中表达最高,相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$) = 0.95 ± 0.06 ,见图 1。

2.2 DNALK5 对 MDA-MB-231 增殖改变 显性阴性突变的 ALK5 腺病毒(AdDNALK5)感染 MDA-MB-231 后,第 3 天 AdDNALK5 组细胞的吸光度值为 0.35 ± 0.04 ,明显低于 RFP 组(0.58 ± 0.06)和空白对照 MDA-MB-231 组(0.61 ± 0.05),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。第 5 天 AdDNALK5 组细胞的

吸光度值为 0.49 ± 0.06 , 明显低于 RFP 组 (0.93 ± 0.07) 和 MDA-MB-231 组 (0.97 ± 0.05), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 DNALK5 对 MDA-MB-231 细胞周期改变 采取流式细胞术检测 AdDNALK5 感染 MDA-MB-231 3 d 后 MDA-MB-231 细胞周期改变。AdDNALK5 组细胞周期 G_0 期占 (85 ± 9)%, 明显低于 RFP 组的 G_0 期 [(61 ± 8)%] 和 MDA-MB-231 组的 G_0 期 [(65 ± 6)%] 比例。

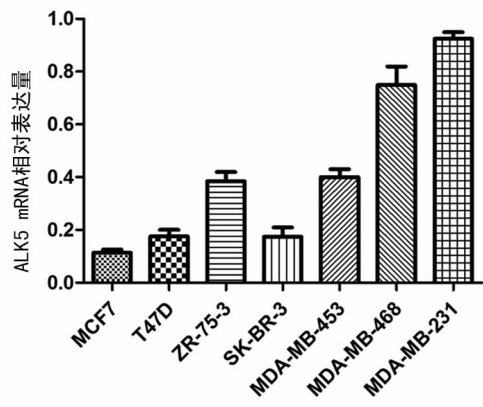


图 1 ALK5 在不同转移能力的乳腺癌细胞中表达

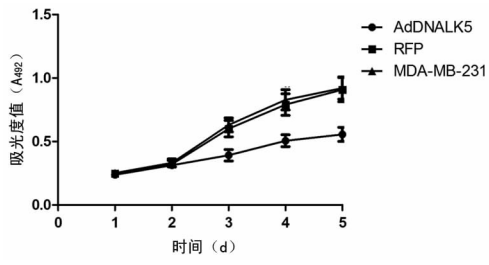


图 2 DNALK5 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

2.4 DNALK5 对 ID1、CyclinD1 基因和蛋白表达改变 通过荧光定量 PCR 和 western blot 检测 ID1、CyclinD1 mRNA 和蛋白的改变, AdDNALK5 组 ID1 和 CyclinD1 mRNA 相对于 RFP 组的表达量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 分别为 0.45 和 0.52。western blot 检测 AdDNALK5 组 ID1 和 CyclinD1 蛋白的改变, 得到与 mRNA 一致的结果。见图 3。

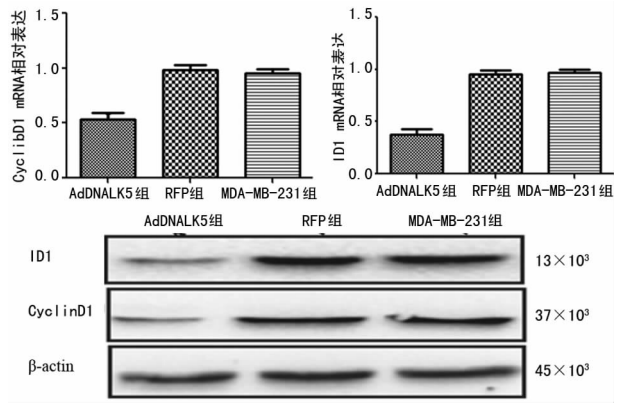


图 3 DNALK5 对 MDA-MB-231 细胞周期相关 ID1 和 CyclinD1 mRNA 和蛋白表达改变

2.5 DNALK5 对 MDA-MB-231 TGF- β /SMAD 信号通路的影响 AdDNALK5 感染 MDA-MB-231 后, 可抑制 TGF- β /SMAD 信号通路, western blot 检测其对 TGF- β /SMAD 信号通路的影响, 发现 SMAD2/3 总的蛋白无改变, 但 AdDNALK5 组 SMAD2/3 磷酸化蛋白表达明显低于 RFP 和 MDA-MB-231 组, 见图 4。

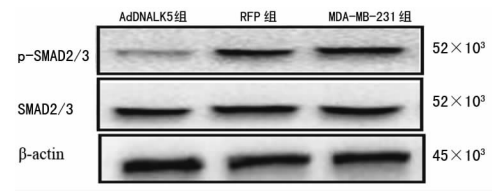


图 4 DNALK5 对 MDA-MB-231 TGF- β /SMAD 信号通路的关键蛋白 SMAD2/3 总蛋白和磷酸化蛋白的改变

3 讨论

乳腺癌作为女性常见的恶性肿瘤, 一直是研究热点, 尤其是三阴性乳腺癌的治疗是亟待解决的医学难题。有文献报道 TGF- β /SMAD 信号通路的持续激活促进乳腺癌的发生、发展^[11]。如果能抑制 TGF- β /SMAD 信号通路的激活, 将在一定程度上促进乳腺癌向良性过程转变。ALK5 作为 TGF- β 膜结合受体, 抑制 ALK5 的表达, 将抑制 TGF- β /SMAD 信号通路的激活^[12]。显性负性突变技术是一种基因工程技术, 通过构建膜蛋白的胞外域结构, 突变型的受体能够与野生型受体竞争性结合 TGF- β 配体, 使信号不能通过 TGF- β /SMAD 传到核内, 调节细胞基因转录和调控。因此, 显性负性突变技术是肿瘤生物治疗的一种良好技术, 显示其良好优势。显性负性突变技术和腺病毒感染技术能够对乳腺癌实行有效的生物治疗。

本研究系统分析 ALK5 在转移能力不同的乳腺癌细胞中的表达, 发现 ALK5 在乳腺癌中普遍表达, 在三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 中发现 DNALK5 能够显著抑制 MDA-MB-231 的增殖, 其 DNALK5 腺病毒感染 MDA-MB-231 后, 第 3 天吸光度值 (0.35 ± 0.04) 明显低于 RFP 组 (0.58 ± 0.06), 流式细胞术结果也显示细胞周期为 G_0 期阻滞。进一步深入其作用机制发现 DNALK5 确实能抑制 TGF- β /SMAD 信号通路的激活, 而且能下调其靶向基因 ID1 的表达。通过体外实验证实 DNALK5 阻断 TGF- β /SMAD 信号通路, 能够在 mRNA 和蛋白水平抑制 ID1 表达, 其机制主要就是通过下调磷酸化 SMAD2/3 表达来实现的。本研究在一定程度上找到治疗三阴性乳腺癌的基因治疗方法, 但其在体内作用如何今后还将进行深入研究。

参考文献

[1] DHAHRI W, DUSSAULT S, HADDAD P, et al. Reduced expression of let-7f activates TGF- β /ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure[J]. J Cell (下转第 1909 页)

疗与纠正具有一定的辅助作用,对于围绝经期甲亢女性患者的生活质量水平具有较强的促进作用^[15],在临床上饮食指导上应当予以推广应用。

综上所述,围绝经期甲亢女性患者的生活质量水平较低,离异或丧偶、家庭经济月收入<2 000 元、家庭关系不和睦、合并其他疾病是其主要危险因素,长期食用豆制品是其保护性因素,应当加强此类患者的家庭关怀,给予充分的心理支持,积极治疗和控制其他合并疾病,指导增加豆制品饮食,以提高生活质量水平。

参考文献

[1] 康爱琴. 更年期妇女健康状况及影响因素分析[J]. 中国妇幼保健,2013,28(2):283-286.

[2] 吴小英. 更年期话语的建构:从医界、大众文化到女性自身的叙述[J]. 妇女研究论丛,2013,15(4):87-94.

[3] 崔亚美,阮祥燕,田玄玄,等. 北京妇产医院就诊妇女更年期症状发生率的调查研究[J]. 首都医科大学学报,2014,14(4):392-396.

[4] DURICA S. Use of estrogen replacement therapy in menopause: Secondary prevention of osteoporosis [J]. Vo-jnosanitetski Pregled,2012,64(1):37-44.

[5] 白淑侠,杜吉侠,李丽,等. 循证护理对甲亢患者心理健康和生活质量的影响[J]. 西部中医药,2014,19(12):118-120.

[6] 周燕,徐亮,陈敏,等. 更年期妇女症状与生存质量及激素水平相关性研究[J]. 护理研究,2014,16(33):4156-4157.

(上接第 1905 页)

Mol Med,2017,21(9):2211-2222.

[2] NORITA R,SUZUKI Y,FURUTANI Y,et al. Vasohib-in-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating transforming growth factor-β signaling[J]. Cancer Sci,2017,108(3):419-426.

[3] GESTEIRA T F,COULSON-THOMAS V J,YUAN Y,et al. Lumican peptides:rational design targeting ALK5/TGFBRI[J]. Sci Rep,2017,7:42057-42061.

[4] KUNNEN S J,LEONHARD W N,SEMEINS C,et al. Fluid shear stress-induced TGF-β/ALK5 signaling in renal epithelial cells is modulated by MEK1/2[J]. Cell Mol Life Sci,2017,74(12):2283-2298.

[5] SON J Y,PARK S Y,KIM S J,et al. EW-7197,a novel ALK-5 kinase inhibitor,potently inhibits breast to lung metastasis[J]. Mol Cancer Ther,2014,13(7):1704-1716.

[6] 陆永江,曹江,张彦秋. 运动致软骨损伤发生过程中 TGF/β/ALK/Smad 信号通路的表达变化[J]. 西安体育学院学报,2016,33(3):351-356.

[7] WITTE D,ZEEH F,GÄDEKEN T,et al. Proteinase-activated receptor 2 is a novel regulator of TGF-β signaling in pancreatic cancer [J]. J Clin Med,2016,5(12):E111-

[7] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2013:312-314.

[8] FEELEMYER J P,DES JARLAIS D C,ARASTEH K,et al. Changes in quality of Life (WHOQOL-BREF) and addiction severity index (ASI) among participants in opioid substitution treatment (OST) in low and middle income countries;an international systematic review[J]. Drug Alcohol Depend,2014,134(1):251-258.

[9] 杨晓飞,关守萍. 甲状腺机能亢进症患者抗甲状腺药物治疗依从性现状及研究进展[J]. 护士进修杂志,2015,18(3):215-217.

[10] 王晓凡,张海芹. 女性更年期综合征现状及影响因素分析[J]. 护理学报,2014,17(6):70-72.

[11] 李润琴,杨建林. 护理干预对甲亢患者生活质量及焦虑状况的影响[J]. 国际护理学杂志,2012,31(9):1669-1670.

[12] ABEDZADEH KALARHOUDI M,TAEBI M,SADAT Z,et al. Assessment of quality of life in menopausal periods;a population study in kashan,Iran[J]. Iran Red Crescent Med J,2011,13(11):811-817.

[13] 聂广宁,王小云,杨洪艳. 114 名城市更年期女性生存质量现状分析[J]. 中国妇幼保健,2013,28(9):1480-1483.

[14] 林小萍. 中西医结合治疗女性更年期甲亢睡眠障碍 30 例[J]. 中外健康文摘,2014,20(27):30-31.

[15] 湛剑飞. 更年期甲亢睡眠障碍与相关激素的变化[J]. 放射免疫学杂志,2013,26(5):568-569.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-05-10)

E115.

[8] YANG C,WANG Y,XU H. Fluoride regulate osteoblastic transforming growth factor-β1 signaling by mediating recycling of the type I receptor ALK5[J]. PLoS One,2017,12(1):e0170674.

[9] HARA T,YOSHIDA E,SHINKAI Y,et al. Biglycan intensifies ALK5-Smad2/3 Signaling by TGF-β1 and down-regulates syndecan-4 in cultured vascular endothelial cells [J]. J Cell Biochem,2017,118(5):1087-1096.

[10] KIM S W,KIM S J,SANG A P,et al. Abstract 1918: Anti-metastasis effect of EW-7197,a novel ALK5 inhibitor in both breast cancer cells in vitro and mouse model in vivo[J]. Cancer Res,2012,72(8 Suppl):1918-1922.

[11] ANDERBERG C,CUNHA S I,ZHAI ZHENHUA,et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination[J]. J Exp Med,2013,210(3):563-579.

[12] 梁莹,赵胜男,常秀峰,等. 逍遥丸对人卵巢壁颗粒细胞 ALK5/Smads 通路的影响[J]. 中医杂志,2013,54(9):754-757.

(收稿日期:2017-12-10 修回日期:2018-04-19)