

血管紧张素 II 通过AT1R/ERK/MAPK 信号通路影响乳腺癌细胞MCF-7的 增殖能力

钟小红^{1,2} 吴晓安² 胡冰¹

1. 安徽医科大学附属省立医院肿瘤内科, 安徽 合肥 230001 ;
2. 解放军第 174 医院肿瘤内科, 福建 厦门 361003

[摘要] 背景与目的: 研究表明, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 与肿瘤发生、发展密切相关, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是RAS系统最重要的组成部分。本文旨在探讨 Ang II 对乳腺癌细胞株MCF-7细胞增殖的作用及其机理。**方法:** 采用CCK8法观察Ang II 对MCF-7细胞增殖的影响、氯沙坦 (AT1R抑制剂) 及PD98059 (MAPK抑制剂) 对Ang II 介导MCF-7细胞增殖变化的影响; 利用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测不同浓度Ang II 处理MCF-7细胞后ERK及p-ERK1/2蛋白的表达变化。**结果:** Ang II 具有明显的促MCF-7细胞增殖作用, 并呈时间和剂量依赖性, 分别在24 h和 10^{-7} mol/L浓度处理时促进作用最为显著 ($P < 0.0001$); 氯沙坦能显著降低Ang II 促进细胞增殖的作用 ($P = 0.022$); Western blot检测结果显示, Ang II 能激活p-ERK蛋白的表达水平; 进一步用MAPK抑制剂PD98059处理能够部分逆转Ang II 的促细胞增殖作用。**结论:** Ang II 通过激活AT1R/ERK信号通路增强乳腺癌细胞MCF-7的增殖能力, 使用AT1R抑制剂或MAPK抑制剂均能抑制Ang II 的作用。因此, 靶向Ang II /AT1R/MAPK可能为乳腺癌治疗提供新的途径。

[关键词] 乳腺癌; 血管紧张素 II; AT1R; ERK1/2; 细胞增殖

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.09.003

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)09-0652-05

The effects of angiotensin II on the proliferation in human breast cancer cell line MCF-7 through AT1R/ERK/MAPK pathway ZHONG Xiao-hong^{1,2}, WU Xiao-an², HU Bing¹ (1.Cancer Institute of Anhui Medical University Provincial Hospital, Hefei Anhui 230001, China; 2.Cancer Institute of People's Liberation Army, 174 Hospital, Xiamen Fujian 361003, China)

Correspondence to: HU bing E-mail: hubin3756@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Studies have shown that renin-angiotensin system (RAS) is closely associated with tumor progress. angiotensin II (Ang II) is the most important component of RAS. This study aimed to investigate the possible mechanism by which Ang II affected the cell proliferation in human breast cancer cell line MCF-7. **Methods:** CCK-8 was used to investigate the cell proliferation alteration of MCF-7 cells after treatment of Ang II at different dose and time. The influence of losartan (an AT1R inhibitor) and PD98059 (a MAPK inhibitor) in Ang II-enhanced cell proliferation was detected by CCK-8. Protein expression was analyzed by Western blot. **Results:** Ang II stimulated the growth of breast cancer cells in a dose- and time-dependent manner. The maximal proliferation effect on MCF-7 cells was obtained with 10^{-7} mol/L Ang II and 24 h, respectively ($P < 0.0001$). Losartan significantly decreased the level of Ang II-induced proliferative effects ($P < 0.05$). Western blot showed that Ang II caused rapid activation of p-ERK. In addition, PD98059 could significantly suppress Ang II-promoted cell proliferation. **Conclusion:** Ang II can promote MCF-7 cell proliferation through AT1R/ERK/MAPK pathway activation, which could be reversed by losartan or PD98059. Therefore, targeting Ang II/AT1R/MAPK signaling could be a novel therapeutic for breast cancer.

[Key words] Breast cancer; Angiotensin II; AT1R; ERK1/2; Cell proliferation

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤，严重危害广大女性的健康和生命。美国癌症统计报告指出，在活到85岁的妇女中，将有1/8的人患乳腺癌^[1]。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是人体内重要的体液调节系统，近年来，越来越多的研究证实RAS系统功能的异常激活与肿瘤的发生、发展密切相关。

血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)是RAS系统最重要的组成成分，有研究证实Ang II的I型受体(AT1R)在乳腺癌细胞及组织中表达显著增高^[2-3]，而Ang II的生理作用几乎都是通过激动AT1R产生的。本研究旨在探讨Ang II对乳腺癌细胞MCF-7增殖能力的影响，以及AT1R抑制剂及其下游ERK/MAPK信号通路抑制剂能否部分逆转Ang II对MCF-7细胞增殖能力的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的人乳腺癌细胞株MCF-7购自美国模式培养物集存库；细胞用培养基RPMI-1640加10%胎牛血清培养。传代时用0.25%的胰蛋白酶消化，按1:3的比例传代。Ang II购自美国Sigma公司，货号A9525，用去离子水溶解，配制母液浓度 10^{-3} mol/L， -20°C 保存。氯沙坦购于美国Selleckchem公司，货号S1359，用PBS溶解，配制母液浓度 10^{-2} mol/L， -80°C 保存。PD98059(MEK1 Inhibitor, 9900, 1.5 mg)、p44/42 MAPK(Erk1/2, 9102, 1:1000)及Phospho-MAPK (Erk1/2, 4376, 1:1000)抗体购自美国Cell signaling公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK8法检测细胞增殖

以2 500个/孔(100 μL /孔)的浓度将处于对数期的细胞接种到96孔板，每孔设3个对照孔；待细胞贴壁后，分别予以不同处理后，每孔加入10 μL CCK8，温育2 h；用自动酶标仪在450 nm波长处，测定各孔的吸光度(A)值，最后取各样本的平均值进行比较。

1.2.2 蛋白质印迹法(Western blot)检测

细胞收集后加入RIPA裂解液(1 \times PBS, 1%NP40, 0.1%SDS, 5×10^{-3} mol/L EDTA, 0.5%去氧胆酸钠, 1×10^{-3} mol/L原钒酸钠)，常规方法提取细胞的总蛋白，BCA法测定蛋白浓度；取30 μg 蛋白质，行10%SDS-PAGE电泳；电泳完毕后，于 4°C 、90 V电转移2 h至PVDF膜上；PVDF膜用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h；后加入一抗 4°C 温育过夜；洗膜后，加入二抗，室温温育1.5 h；洗膜后，加入现配的增强型化学发光试剂(ECL)常规显像；以 β -actin为内对照。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0软件包进行统计学处理。组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II对乳腺癌细胞增殖的影响

为了研究Ang II对细胞增殖的影响，本研究首先用浓度为 10^{-7} mol/L的Ang II处理细胞，分别在0、12和24 h检测A值。结果显示，Ang II在24 h时对MCF-7细胞增殖的促进作用最显著($P < 0.000 1$ ，图1A)，在0和24 h时的A值分别为 $0.661 3 \pm 0.005 9$ 和 $0.892 3 \pm 0.002 1$ 。随后用不同浓度($0 \sim 10^{-5}$ mol/L)的Ang II处理MCF-7细胞，细胞培养24 h后检测A值。结果表明，Ang II对MCF-7细胞增殖的促进作用在 10^{-7} mol/L最明显($P < 0.000 1$ ，图1B)，0和 10^{-7} mol/L时的A值分别为 $0.485 3 \pm 0.005 7$ 和 $0.724 0 \pm 0.022 5$ 。以上结果提示，Ang II促进乳腺癌细胞MCF-7的增殖能力，并呈现时间及剂量依赖性。

2.2 Ang II通过AT1R途径促进乳腺癌细胞增殖

Ang II的生理功能几乎都是通过结合AT1R来起作用的。为了研究AT1R在Ang II促细胞增殖中的作用，本研究将MCF-7细胞分为4组：空白组、Ang II组、氯沙坦组和Ang II+氯沙坦组。CCK8法结果显示，Ang II组的细胞增殖能力较空白组明显提高($P = 0.028$)，Ang II+

氯沙坦组的细胞增殖能力较Ang II组明显下降($P=0.022$, 图2)。而氯沙坦组与空白组相比, 差异无统计学意义($P=0.981$)。这些结果显示, Ang II通过AT1R来促进乳腺癌细胞MCF-7的增殖能力。

2.3 Ang II 激活ERK/MAPK信号通路

为了进一步研究Ang II促进MCF-7细胞增殖能力的机制, 我们检测了AT1R的下游MAPK信号通路主要蛋白的表达情况。在不同浓度的Ang II处理MCF-7细胞后, 收集蛋白, 用Western blot检测ERK和p-ERK蛋白的表达水平。在不同浓度的Ang II处理下, ERK蛋白的表达水平均无明显变化; 而p-ERK蛋白的表达水平呈浓度依赖性增加($0\sim 10^{-7}$ mol/L), 在 10^{-7} mol/L时, p-ERK蛋白的表达水平较空白组明显增加

(图3)。结果提示, Ang II能够激活ERK/MAPK信号通路。

2.4 Ang II 通过ERK/MAPK途径促进乳腺癌细胞增殖

为了研究ERK/MAPK是否在Ang II/AT1R介导的促细胞增殖效应中起作用, 本研究使用PD98059(一种MAPK抑制剂)处理MCF-7细胞, 将其分为4组: 空白组、Ang II组、PD98059组和Ang II+PD98059组。Ang II组的细胞增殖能力较空白组明显提高($P=0.013$), Ang II+PD98059组的细胞增殖能力较Ang II组显著下降($P=0.017$)。且PD98059组的细胞增殖能力也较空白组略微下降($P=0.023$, 图4)。以上结果显示, Ang II促乳腺癌细胞增殖作用与ERK/MAPK信号通路密切相关, 并可被MAPK抑制剂部分抑制。

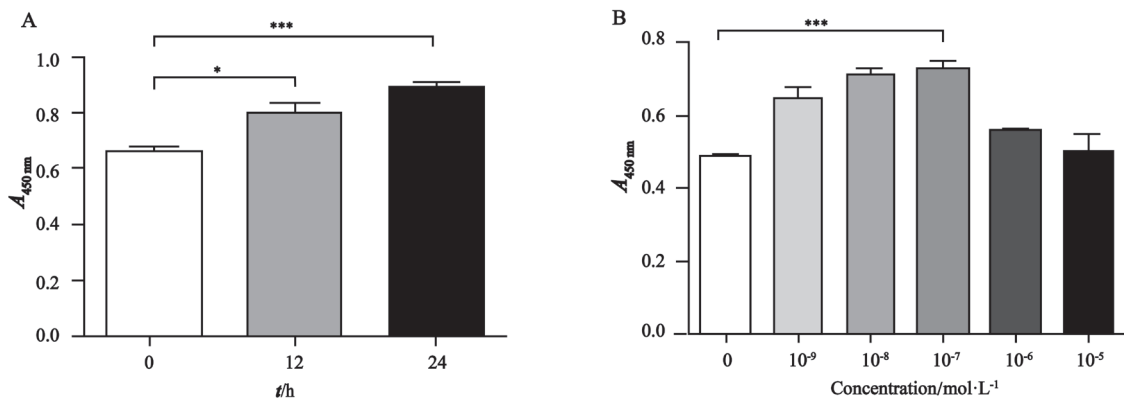


图1 CCK8法检测Ang II对MCF-7细胞增殖的影响

Fig. 1 The proliferative ability of MCF-7 cells treated with Ang II by CCK-8 method

*: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

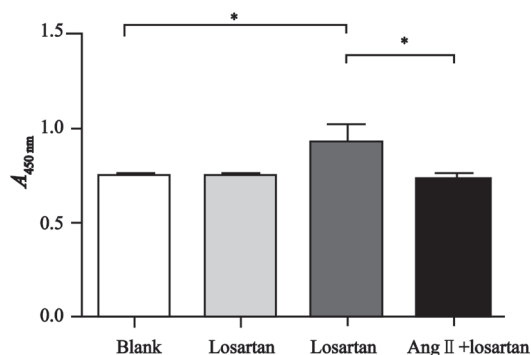


图2 CCK8法检测氯沙坦对细胞增殖的影响

Fig. 2 The proliferation of MCF-7 cells treated with losartan by CCK-8 method

*: $P<0.05$.

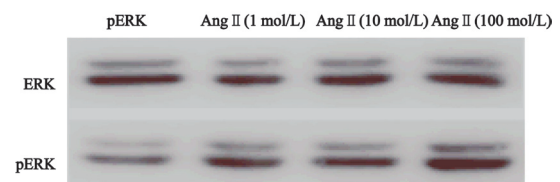


图3 Western blot检测Ang II对p-ERK蛋白表达的影响

Fig. 3 p-ERK protein level in MCF-7 treated with different dose of Ang II detected by Western blot

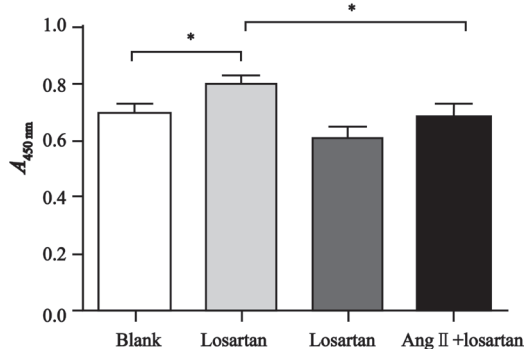


图4 CCK8法检测MAPK抑制剂PD98059对细胞增殖的影响

Fig. 4 The proliferative ability of MCF-7 cells treated with MAPK inhibitor-PD98059 detected by CCK-8 method

*: $P < 0.05$.

3 讨论

越来越多的研究证实, Ang II及AT1R在人类多种肿瘤细胞及组织中高表达, 包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、卵巢癌及宫颈癌等, 且与肿瘤的患病风险及不良预后密切相关^[4]。一项研究报道使用免疫组化检测AT1R蛋白的表达, 发现其在乳腺癌组织中的表达较正常组织明显增高, 进一步用Western blot检测乳腺癌细胞系中AT1R的表达, 发现MCF-7、T47D、MDA-MB-231细胞中均有表达, 且MCF-7的表达量最高^[3]。这些结果均提示Ang II及AT1R可能参与乳腺癌的发生、发展过程。Lewandowska等^[5]的研究表明, Ang II可调节MCF-7细胞的酪氨酸激酶活性, 而酪氨酸受体EGFR在乳腺癌细胞中过表达, 可调控多条信号通路, 包括MAPK、PI3K/AKT及STAT3等。但是, MAPK信号通路是否参与Ang II/AT1R的促MCF-7细胞增殖作用尚不清楚。

本研究发现, 不同浓度的Ang II对乳腺癌细胞MCF-7增殖能力具有不同的作用效果: 较低浓度的Ang II ($0 \sim 10^{-7}$ mol/L)呈浓度依赖性增强其细胞增殖能力, 而较高浓度的Ang II (10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)反而使其细胞增殖能力的增强幅度明显降低。究其原因, 可能与较高浓度的Ang II作用下AT1R表达异常调节有关(如下调、内在化

及去偶联等), 但具体机制尚不清楚。此外, 本研究发现Ang II对MCF-7细胞的促增殖作用具有时间依赖性, 且在24 h时作用最为显著。这些结果与之前对Ang II促进细胞增殖作用的报道相一致^[6]。那么, Ang II的促细胞增殖能力是否是由其主要效应受体AT1R来介导的呢? 胡丽娟等^[7]用厄贝沙坦(一种AT1R阻滞剂)处理MCF-7, 发现细胞的增殖能力明显受到抑制。为了进一步验证AT1R介导Ang II的促细胞增殖能力, 我们使用氯沙坦(另一种AT1R抑制剂, ARBs)处理细胞, 结果证实阻断AT1R途径, 即使用氯沙坦能显著抑制Ang II的促细胞增殖能力。这些结果均提示, Ang II通过AT1R来促进乳腺癌细胞MCF-7的增殖能力; 而氯沙坦能够有效抑制Ang II的这一作用。

我们接着研究了Ang II促乳腺癌细胞MCF-7增殖的可能机制。ERK蛋白是MAPK信号通路中重要的下游效应蛋白之一, 激活后呈磷酸化的状态, 即p-ERK。本研究用Western blot检测ERK及p-ERK蛋白的表达, 结果显示, 不同浓度的Ang II对ERK蛋白的表达均无明显作用, 但能增加MCF-7细胞中磷酸化的ERK蛋白的表达, 且呈浓度依赖性, 在 10^{-7} mol/L时p-ERK的表达增加最为显著, 提示ERK/MAPK信号通路可能参与Ang II/AT1R介导的MCF-7细胞增殖能力的增强。进一步使用ERK/MAPK抑制剂PD98059处理细胞, CCK8法检测结果证实了Ang II的促细胞增殖效应能够被显著阻断。这也与之前的研究结果相一致^[3], 该研究证实Ang II激活Ras-Raf-MAPK信号通路, 进一步导致转录因子NF-kappaB和CREB的激活, 最终导致乳腺癌细胞增殖能力的增强。

综上所述, 本研究结果初步证实了Ang II促进乳腺癌细胞MCF-7的增殖能力, 与AT1R/ERK/MAPK信号通路的激活有关; 选择性地抑制AT1R或抑制ERK/MAPK信号通路均可阻断Ang II的促细胞增殖作用。ARBs已经被广泛应用于临床治疗高血压、糖尿病及肾病等疾病, 而最近美国食品药品监督管理局(Food and Drug

Administration, FDA)的官方调查及新近两篇Meta分析均证实,使用ARBs不会增加新发肿瘤的风险^[8-9]。此外,Diop-Frimpong等^[10]的研究结果显示,氯沙坦还可抑制肿瘤相关成纤维细胞中胶原蛋白 I 的产生,从而提高化疗的疗效。因此,将AT1R作为靶点,开发相应的靶向药物的前景显得更为广阔,而ERK/MAPK信号通路涉及的因子较多,这也为基因治疗提供了更多的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] RHODES D R, ATEEQ B, CAO Q, et al. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(25): 10284-10289.
- [3] DU N, FENG J, HU L J, et al. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling [J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1893-1903.
- [4] WEGMAN-OSTROSKY T, SOTO-REYES E, VIDAL-MILLAN S, et al. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2013. [Epub ahead of print]
- [5] LEWANDOWSKA U, LACHOWICZ-OCHEDELSKA A, DOMINSKA K, et al. Angiotensin II as a factor modulating protein tyrosine kinase activity in two breast cancer lines - MCF-7 and MDA-MB-231 [J]. Endokrynol Pol, 2011, 62(2): 151-158.
- [6] ZHAO Y, CHEN X, CAI L, et al. Angiotensin II/angiotensin II type I receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway [J]. J Cell Physiol, 2010, 225(1): 168-173.
- [7] 胡丽娟, 杜宁, 孙欣, 等. 厄贝沙坦通过MAPK-ERK1/2信号通路影响乳腺癌MCF-7细胞的增殖 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(6): 607-608.
- [8] COLLABORATION A R B T. Effects of telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, and losartan on cancers in 15 trials enrolling 138,769 individuals [J]. J Hypertens, 2011, 29(4): 623-635.
- [9] BANGALORE S, KUMAR S, KJELDSSEN S E, et al. Antihypertensive drugs and risk of cancer: network meta-analyses and trial sequential analyses of 324,168 participants from randomised trials [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(1): 65-82.
- [10] DIOP-FRIMPONG B, CHAUHAN V P, KRANE S, et al. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(7): 2909-2914.

(收稿日期: 2014-05-27 修回日期: 2014-08-13)

“癌症研究新视野大会”将于上海举行

由美国癌症研究学会 (American Association for Cancer Research, AACR) 主办的“癌症研究新视野大会”将于2014年10月9-12日在上海金茂君悦大酒店举行。本届会议主题为“靶向治疗的突破”,将着重介绍癌症研究的主要领域中最新、最令人振奋的科研成果,并为世界各地的癌症研究者们提供沟通交流和科学互动的宝贵平台,推动癌症科学与医学的发展,促进国际间合作。大会议程覆盖了癌症研究的全部领域,从基础研究到转化医学,再到临床,众多国内外知名专家教授将会呈上一场场精彩演讲。同时我们还会带来AACR 2014全球年会(2014年4月5-9日在圣地亚哥举行)上的精彩内容。更多详情请登陆大会网站 www.AACR.com.cn, 联系热线 86-21-23123591。