

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00900

## 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭转移中 JAK 抑制对 ERK 的作用及意义

陈红芳<sup>1</sup>, 张亚梅<sup>2</sup>, 邓华瑜<sup>1\*</sup>

1. 重庆医科大学病理生理学教研室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016

**[摘要]** 目的: 研究 JAK 激酶抑制剂 AG490 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)磷酸化的影响, 探讨 JAK 激酶对 ERK 信号转导通路的作用以及在乳腺癌细胞侵袭转移中的调控意义。方法: 以 JAK 激酶抑制剂 AG490 处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, MTT 法检测 AG490 对细胞的生长抑制作用; MTT 法检测 AG490 处理后细胞对人工基底膜 Matrigel 的黏附能力变化; Transwell 小室进行人工重组基底膜侵袭和迁移实验, 检测 AG490 处理后细胞侵袭、迁移能力变化; Western 印迹法检测 AG490 处理后细胞中磷酸化 ERK(P-ERK)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白水平变化。结果: 应用 JAK 酶抑制剂 AG490 后 MDA-MB-231 细胞生长受到抑制, 作用呈时效-量效依赖关系; MDA-MB-231 细胞黏附、侵袭、迁移能力降低, 同时细胞中 P-ERK、MMP-9 蛋白减少。结论: JAK 激酶可以通过改变 ERK 的磷酸化水平影响 ERK 信号转导通路的活化。JAK 激酶抑制对 ERK 信号转导通路的激活有阻断作用, 可以抑制 MMP-9 的表达及乳腺癌细胞的侵袭转移。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; JAK; ERK; 肿瘤侵袭; 肿瘤转移

**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0900-04

### Effect of Janus kinase inhibition on extracellular signal-regulated protein kinase during invasion and metastasis of human breast cancer cell MDA-MB-231

CHEN Hong-fang<sup>1</sup>, ZHANG Ya-mei<sup>2</sup>, DENG Hua-yu<sup>1\*</sup>

1. Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the influence of Janus kinase inhibitor AG490 on phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) in the human breast cancer cell line MDA-MB-231, so as to discuss the effect of JAK on ERK signal transduction pathway and on invasion/metastasis of breast cancer cells. **Methods:** MDA-MB-231 cells were treated with Janus kinase inhibitor AG490; MTT assay was used to examine the proliferation of MDA-MB-231 cells and the adhesion of MDA-MB-231 cells to artificial basement membrane matrigel after AG490 treatment. Invasion and metastasis of MDA-MB-231 cells were evaluated with transwell chamber after treated with AG490. The expression of P-ERK and MMP-9 protein was determined by Western blotting assay. **Results:** AG490 inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in a time- and dose-dependent manner; AG490 also depressed the adhesion, invasion and metastasis of MDA-MB-231 cells. Meanwhile, the expression of P-ERK and MMP-9 protein was decreased after treatment with AG490. **Conclusion:** Our study indicates that JAK kinase can affect the activity of ERK signal transduction pathway through the phosphorylation of ERK. The inhibitory effects of JAK kinase on MMP-9 expression and invasion of breast cancer cells are associated with the blocking of the ERK signaling pathway.

**[KEY WORDS]** breast neoplasms; JAK; ERK; neoplasm invasion; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 900-903]

细胞内各种不同的信号通路之间构成复杂的信号网络系统, 具有高度的非线性特征, 酪氨酸蛋白激酶在各种信号通路上可能交叉穿梭的催化磷酸化作用。JAK (Janus activated kinase, JAK) 是一种非受体酪氨酸激酶, 它可以促使带有酪氨酸的蛋白发生

磷酸化而活化, 重要的下游分子是信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT), 构成 JAK/STAT 信号转导通路。最近研究发现, JAK 激酶可以使丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK)

**[收稿日期]** 2008-01-12 **[接受日期]** 2008-06-24

**[作者简介]** 陈红芳, 硕士, E-mail: cqchenhf@yahoo.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-68817865. E-mail: cqdenghy@yahoo.com.cn

信号通路中的细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)磷酸化, ERK活化后调控一系列靶基因的表达,从而影响细胞的生物学行为<sup>[1-3]</sup>。本研究选用ER(-)、高转移性乳腺癌细胞株MDA-MB-231为实验对象,应用JAK酶抑制剂AG490处理乳腺癌细胞MDA-MB-231,观察JAK激酶抑制后ERK磷酸化水平及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)表达变化和细胞增殖、黏附、侵袭、迁移能力变化,探讨JAK激酶对ERK信号转导通路影响及在乳腺癌细胞侵袭转移调控中的意义。

## 1 材料和方法

1.1 材料 细胞系:乳腺癌细胞MDA-MB-231,小鼠成纤维细胞NIH3T3,均由本教研室提供。RPMI 1640干粉培养基:美国Gibco公司。新生牛血清:TBD公司。重组人工基底膜Matrigel:美国BD公司。Transwell Chamber(8  $\mu\text{m}$  孔径):美国Costar公司。MTT:美国Sigma公司。P-ERK鼠抗人单克隆抗体、MMP-9鼠抗人单克隆、 $\beta$ -actin鼠抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG:Santa Cruz公司(北京中杉分装)。RIPA细胞裂解液:上海中能博彩生物科技有限公司。BeyoECL, Western荧光检测试剂:碧云天生物技术研究。自动酶标仪、PAGE凝胶电泳仪、垂直电泳槽、电泳凝胶图像分析系统:美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养 将乳腺癌细胞MDA-MB-231及小鼠成纤维细胞NIH3T3常规复苏,接种于含10%新生牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数为5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的孵箱中培养。

1.3 MTT法测定AG490对细胞增殖的影响 取对数生长期的MDA-MB-231细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ /ml。取3块96孔培养板每孔接种细胞悬液200  $\mu\text{l}$ ,于细胞接种24 h后分别加入20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  AG490,同时设未加药组,每组设5个平行孔。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度孵箱内培养。分别培养24、48和72 h后弃上清,每孔加入MTT 20  $\mu\text{l}$ (5 mg/ml)及无血清RPMI 1640 200  $\mu\text{l}$ 继续培养4 h,取出后2 000 r/min( $r=45$  cm)离心10 min,弃上清,每孔加200  $\mu\text{l}$  DMSO震荡10 min,用自动酶标分析仪在570 nm波长处测定各孔光密度值( $D$ )。实验重复3次,取平均值。计算药物在不同浓度、不同作用时间对MDA-MB-231细胞的抑制率。细胞生长抑制率 =  $[1 - (\text{AG490组}$

$D_{570}$ /未加药组  $D_{570})] \times 100\%$ 。

1.4 实验分组 对照组不加药,每天换RPMI 1640培养液;实验组将AG490用RPMI 1640培养液调整浓度至40  $\mu\text{mol/L}$ 。细胞进入对数生长期后加药处理用于实验。每24 h换液以维持药物浓度。

1.5 黏附实验 常规细胞培养,细胞进入对数生长期后,实验组加入40  $\mu\text{mol/L}$  AG490处理72 h。96孔培养板用Matrigel 5  $\mu\text{g}$  包被,置超净工作台内风干,用2%BSA封板处理。取对照组及实验组细胞,消化离心计数活细胞,用0.1%BSA-RPMI 1640调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ /ml加入96孔培养板,每孔加入细胞悬液200  $\mu\text{l}$ ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数为5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的孵箱中培养。对照组及实验组分别设立试剂对照孔、细胞对照孔及实验孔,同时平行设5个复孔。实验重复3次。分别孵育30、60、90、120 min之后弃去各孔培养液,实验孔经PBS冲洗,弃PBS后加入无血清RPMI 1640培养液200  $\mu\text{l}$ 及MTT溶液20  $\mu\text{l}$ ;试剂对照孔及细胞对照孔不冲洗,弃培养液后直接加入无血清RPMI 1640培养液200  $\mu\text{l}$ 及MTT溶液20  $\mu\text{l}$ ;继续培养4 h。吸弃各孔培养液,加DMSO 200  $\mu\text{l}$ ,用微量振荡仪振荡10 min,使甲臞充分溶解,用自动酶标仪测  $D_{570}$ ,计算黏附率。细胞黏附率 = (实验孔  $D_{570}$ /细胞对照孔  $D_{570}) \times 100\%$ 。

1.6 侵袭实验 常规培养NIH 3T3细胞,当细胞生长达80%融合状态时用生理盐水洗3次,然后加无血清RPMI 1640液继续培养24 h后收集上清液,2 000 r/min( $r=45$  cm)离心5 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将Matrigel按40  $\mu\text{l}$ /孔均匀的铺在Transwell Chamber底部聚碳酸酯膜上。取对照组和实验组细胞(加药处理72 h),PBS冲洗去除死细胞和细胞碎片,消化离心计数活细胞,调整细胞密度为 $4 \times 10^5$ /ml,分别取0.2 ml接种到成胶的Transwell Chamber,并将Transwell Chamber置于24孔板内,同时在Transwell Chamber下层加入NIH3T3细胞上清液(趋化因子),每孔0.6 ml,培养48 h后取出Transwell Chamber,用棉签头擦掉Matrigel, PBS液洗3次,95%乙醇固定。常规H-E染色,揭下Transwell Chamber膜反贴在载玻片上。结果判定:400倍光镜下,计数每膜5个随机不同视野的穿膜细胞数,取均值,每组平行设3个小室。实验重复3次。

1.7 迁移实验 Transwell Chamber表面不铺Matrigel,其余步骤与侵袭实验相同。

1.8 Western印迹法检测细胞中P-ERK、MMP-9的表达 常规培养细胞,细胞进入对数生长期后,实验组加入40  $\mu\text{mol/L}$  AG490处理24 h,收集对照组

与实验组细胞,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。Brodford 法测定蛋白含量。用蛋白上样缓冲液调整浓度,样品在沸水中煮沸 5 min;按浓缩胶电流 20 mA,分离胶电流 30 mA 电泳,总计电泳时间为 3 h 左右;制作电转三明治,于冰水中 250 mA 恒流电转移 45~60 min。常规封闭、洗膜后与 1:300 鼠抗人 P-ERK、MMP-9 抗体 4℃ 孵育过夜,洗膜后加入 1:1 000 羊抗鼠 IgG/HRP 37℃ 孵育 2 h。ECL 显色。用 Bio-Rad 图像分析系统照像,用 Quantity One 软件分析,数值以相应蛋白条带的灰度值与  $\beta$ -actin 蛋白条带的灰度值表示。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS 8.0 软件进行 *t* 检验和方差分析,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 AG490 对细胞增殖能力的影响 MTT 实验结果表明,AG490 对 MDA-MB-231 细胞增殖有抑

制作用,并随时间延长和药物浓度加大而增强,即呈时效-量效依赖关系(表 1)。

表 1 AG490 对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制率

Tab 1 Inhibitory effect of AG490 on MDA-MB-231 cells growth  
( $n=15, \bar{x} \pm s, \%$ )

Concentration of AG490 $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Inhibitory time <i>t</i> /h		
	24	48	72
20	13.2±2.3	26.7±3.0	42.8±3.5
40	23.7±2.4	43.9±2.2	53.4±2.5
80	33.9±1.4	60.2±2.1	71.3±3.6

$P < 0.05$ , among different concentrations and time groups

2.2 AG490 对细胞黏附 Matrigel 能力的影响 由表 2 可见,随着时间的延长,MDA-MB-231 细胞黏附 Matrigel 能力增加。40  $\mu\text{mol/L}$  AG490 作用 MDA-MB-231 细胞 72 h 后,实验组 MDA-MB-231 细胞黏附能力低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 2 AG490 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响

Tab 2 Effect of AG490 on adhesion ability of MDA-MB-231 cells

( $n=15, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Time <i>t</i> /min			
	30	60	90	120
Control	35.44±2.53	59.62±3.05	80.32±2.57	94.51±2.51
AG490	19.86±1.77**	33.13±2.32**	49.81±1.84**	70.39±1.20**

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

2.3 AG490 对细胞侵袭迁移能力的影响 由表 3 可见,40  $\mu\text{mol/L}$  AG490 处理 72 h 后,MDA-MB-231 细胞的侵袭迁移能力均下降。侵袭实验中,实验组 MDA-MB-231 细胞侵袭穿过 Matrigel 成胶 Transwell Chamber 重组人工基底膜的侵袭细胞数减少,与对照组侵袭细胞数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。迁移实验中,实验组 MDA-MB-231 细胞穿过未经 Matrigel 成胶的人工基底膜的迁移细胞数减少,与对照组迁移细胞数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.4 Western 印迹结果 由图 1 可见,40  $\mu\text{mol/L}$  AG490 作用 MDA-MB-231 细胞 24 h 后可见 P-ERK 和 MMP-9 蛋白表达明显下降,对照组 P-ERK/ $\beta$ -actin 为 1.175,实验组 P-ERK/ $\beta$ -actin 为 0.574。对照组 MMP-9/ $\beta$ -actin 为 0.863,实验组 MMP-9/ $\beta$ -actin 为 0.387。

表 3 AG490 对 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响

Tab 3 Effect of AG490 on invasion and migration of MDA-MB-231 cells

( $n=9, \bar{x} \pm s, / \text{field}$ )

Group	Cell count of invasion	Cell count of migration
Control	90.02±6.49	106.76±6.20
AG490	48.31±4.13*	72.84±7.35*

\*  $P < 0.05$  vs control group

图 1 AG490 对 MDA-MB-231 细胞中 MMP-9 和 P-ERK 蛋白表达的影响

Fig 1 Effect of AG490 on expression of MMP-9 and P-ERK proteins in MDA-MB-231 cells

1:AG490 group;2:Control group

### 3 讨论

JAK 激酶是在信号传递过程中起重要作用的非受体酪氨酸激酶。细胞因子与靶细胞上的特异受体结合后诱导受体聚合成二聚体或三聚体,在胞质内形成高亲和性的 JAKs 结合位点, JAKs 与受体胞浆区域的 JAKs 结合位点结合后发生自身或与受体交叉酪氨酸磷酸化而活化,活化的 JAKs 可以促使带有酪氨酸的蛋白发生磷酸化而活化,产生激酶活化的级联反应,将活化的信号转导给其他分子,引发一系列基因和蛋白质水平的变化<sup>[4]</sup>。ERK 通路是迄今研究得较为透彻、备受关注的重要 MAPK 信号转导通路, ERK 包括相对分子质量为 44 000 的 ERK1 和 42 000 的 ERK2。ERK 活化后进入细胞核内,调控一系列转录因子、细胞周期相关因子和凋亡分子等的表达,调控细胞的增殖、分化、凋亡和侵袭转移<sup>[1]</sup>。ERK 的激活通过丝/苏氨酸残基以及酪氨酸残基磷酸化完成,除受到上游 MAPKK 作用以外, JAK 激酶可能参与其酪氨酸残基磷酸化。已有相关报道见于肝癌细胞 HepG2、Huh7 及乳腺癌细胞株 T47D、MCF7 和 SKBR3 中<sup>[2-3]</sup>。

MMPs 中 MMP-9 是降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重要的酶,参与 ECM 主要成分 IV 型胶原的降解,对于肿瘤细胞侵袭转移行为具有重要意义。MMP-9 启动子区含有转录激活蛋白(activator protein, AP-1)的结合位点, ERK 活化后进入细胞核内诱导一系列基因的表达,可以激活 AP-1,进而促进 MMP-9 的表达,肿瘤的 ERK 呈持续激活状态可导致 MMPs 的表达增强,从而导致细胞外基质降解发生<sup>[5-7]</sup>。

AG490(tyrphosin AG490)是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈的脂类衍生物,特异性抑制 JAK 和下游分子酪氨酸的磷酸化。本研究应用 JAK 激酶抑制剂 AG490 处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231,观察 ERK 磷酸化水平及细胞增殖、侵袭转移能力的改变。结果显示, JAK 激酶被抑制后, ERK 的磷酸化减弱,同时乳腺癌细胞 MDA-MB-231 出现生长抑制,具有时效-量效依赖关系;相应于 ERK 磷酸化减弱,乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 MMP-9 表达减少,黏附、侵袭和迁移能力下降;说明 JAK 激酶可以改变 ERK 的磷酸化水平, ERK 信号转导通路的活

化与 JAK 激酶有关,进而可通过调节 MMP-9 的表达、黏附功能改变参与肿瘤细胞侵袭转移。在乳腺癌细胞的侵袭转移过程中 ERK 的活化对调控细胞外基质降解具有重要作用<sup>[6-7]</sup>。由此,针对酪氨酸磷酸化采用 JAK 激酶抑制可能是阻断 ERK 信号转导通路活化的有效靶点之一,可以抑制下游 MMP-9 的表达,产生抗肿瘤侵袭转移效应。

### [参考文献]

- [1] Chang F, Steehlan L S, Lee J T, Shelton J G, Navolanic P M, Navolanic P M, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention[J]. *Leukemia*, 2003, 17: 1263-1293.
- [2] Saxena N K, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 2497-2507.
- [3] Neilson L M, Zhu J, Xie J, Malabarba M G, Sakamoto K, Wagner K U, et al. Coactivation of janus tyrosine kinase (Jak) 1 positively modulates prolactin-Jak2 signaling in breast cancer: recruitment of ERK and signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and enhancement of Akt and Stat5a/b pathways[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 2218-2232.
- [4] Pellegrini S, Dusanter F I. The structure, regulation and function of the Janus kinase (JAKs) and the signal transducers and activators of transcriptions (STATs) [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 248: 615-633.
- [5] Inamoto T, Azuma H, Sakamoto T, Kiyama S, Ubai T, Kotake Y, et al. Invasive ability of human renal cell carcinoma cell line Caki-2 is accelerated by gamma-aminobutyric acid, via sustained activation of ERK1/2 inducible matrix metalloproteinases [J]. *Cancer Invest*, 2007, 25: 574-583.
- [6] Byun H J, Hong I K, Kim E, Jin Y J, Jeoung D I, Hahn J H, et al. A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 34833-34847.
- [7] Kunigal S, Lakka S S, Gondi C S, Estes N, Rao J S. RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121: 2307-2316.

[本文编辑] 曹 静