

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00252

· 论 著 ·

1,25-二羟基维生素 D₃ 对乳腺癌 MCF-7 细胞 CYP1B1 表达的作用和 COX-2/PGE2 通路机制

袁 磊, 邓华瑜*, 姜 蓉, 丁嵩涛

重庆医科大学病理生理学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 分析 COX-2、p-ER α 、CYP1B1 在人乳腺癌组织和 ER α 阳性表达人乳腺癌细胞系 MCF-7 中的表达规律, 探讨 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃] 在人乳腺癌细胞 MCF-7 中通过 COX-2/PGE2 通路对 CYP1B1 表达和细胞增殖、细胞周期转化的影响及作用机制。**方法** 用免疫组织化学法检测 42 例人乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α 、CYP1B1 的表达, 并分析其相关性; MTT 法检测 1,25(OH)₂D₃ 对 MCF-7 细胞增殖的影响, 并确定后续实验药物浓度; 流式细胞术检测细胞周期; RT-PCR 检测 MCF-7 细胞 COX-2 mRNA 水平; ELISA 法检测细胞培养上清液中 PGE2 水平; 蛋白质印迹法检测 MCF-7 细胞 COX-2、p-ERK、p-ER α 、CYP1B1 蛋白水平; 免疫细胞荧光检测 COX-2、p-ER α 、CYP1B1 蛋白在 MCF-7 中的原位表达。**结果** 在人乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α 、CYP1B1 蛋白呈阳性表达, 两两之间均呈正相关性 ($P < 0.05$)。1,25(OH)₂D₃ 对 MCF-7 细胞增殖具有抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性 ($P < 0.05$)。应用 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ 72 h 后, MCF-7 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期 ($P < 0.05$); 细胞 COX-2 mRNA 表达减少 ($P < 0.05$); 细胞培养上清中 PGE2 水平降低 ($P < 0.01$); COX-2、p-ERK、p-ER α 及 CYP1B1 蛋白表达均减少 ($P < 0.05$)。**结论** 在乳腺癌中, COX-2/PGE2 通路对 CYP1B1 的表达具有正向调控作用。1,25(OH)₂D₃ 可通过抑制 COX-2/PGE2 通路减少 CYP1B1 的表达, 对乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖产生抑制作用。

[关键词] 环氧化酶 2; 1,25-二羟基维生素 D₃; 细胞色素 P4501B1; 乳腺肿瘤**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)03-0252-07

COX-2/PGE2 pathway is involved in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced downregulation of CYP1B1 in breast cancer cell line MCF-7

YUAN Lei, DENG Hua-yu*, JIANG Rong, DING Song-tao

Department of Pathophysiology, Laboratory for Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To analyze the expressions of COX-2, p-ER α and CYP1B1 in human breast cancer tissues and ER α -positive human breast cancer cell line MCF-7, and to investigate the influence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃] on proliferation, cell cycle transformation, and CYP1B1 protein expression in MCF-7 cells. **Methods** Immunohistochemical method was applied to examine the expressions of COX-2, p-ER α and CYP1B1 protein in 42 breast cancer tissues, and their association was analyzed. The effects of 1,25(OH)₂D₃ on MCF-7 cell proliferation was investigated by MTT assay and the optimal concentration of 1,25(OH)₂D₃ was determined for the following experiment. The cell cycle was analyzed by flow cytometry and COX-2 mRNA expression in MCF-7 cells was measured by RT-PCR. PGE2 level was detected by ELISA in the culture supernatant. The expression of COX-2, p-ERK, p-ER α and CYP1B1 protein was determined by Western blotting analysis and the distribution of COX-2, p-ER α and CYP1B1 expression in MCF-7 cells was examined by immune cell fluorescence. **Results** COX-2, p-ER α and CYP1B1 protein were positive in human breast cancer tissues and their expressions were positively correlated with each other ($P < 0.05$). 1,25(OH)₂D₃ inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$). Treatment with 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ for 72 h significantly arrested cell cycle in G₀/G₁ phase ($P < 0.05$), decreased the expression of COX-2 mRNA in MCF-7 cells ($P < 0.05$), decreased PGE2 level in the cell culture supernatant ($P < 0.01$), and down-regulated p-ERK, p-ER α and CYP1B1 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** COX-2/PGE2 pathway plays a positive role in regulating CYP1B1 expression in breast cancer. 1,25(OH)₂D₃ may inhibit the growth of MCF-7 cells and down-regulate CYP1B1 through COX-2/PGE2 pathway.

[收稿日期] 2012-01-07 **[接受日期]** 2012-02-02**[作者简介]** 袁 磊, 硕士. E-mail: cosmicatom@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485478, E-mail: cqdenghy@yahoo.com.cn

[Key words] cyclooxygenase 2; 1,25-dihydroxyvitamin D₃; cytochrome P450 1B1; breast neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(3): 252-258]

2010年全球肿瘤统计报告称乳腺癌是女性中发病率最高的恶性肿瘤, 占有女性癌症病例数的23%, 并且为女性癌症死亡的主因, 占有女性癌症死亡例数的14%^[1]。流行病学研究表明, 日光暴露与乳腺癌的发病率或死亡率呈显著负相关, 提示阳光照射不足导致人体内维生素D合成减少, 与乳腺癌的发病密切相关^[2]; 且有证据表明血浆中高水平维生素D可降低乳腺癌发病风险^[3]。维生素D是一种多功能的激素, 除了在体内对钙磷的代谢发挥重要作用外, 近年研究发现其对多种肿瘤细胞有抑制作用。新的研究表明, 维生素D具有抗炎-抗癌作用^[4]。

炎症微环境在肿瘤发生发展中的作用受到越来越多的重视。在肿瘤生成过程中, 多种炎性细胞因子、生长因子以及癌基因的活化可快速诱导环氧酶2(COX-2)表达, 而COX-2可参与到肿瘤的恶性增殖、侵袭与转移以及血管生成等过程中, 影响肿瘤的进展。COX-2在多种恶性肿瘤中过表达, 包括以雌激素依赖为代表的肿瘤——乳腺癌。已有研究报告, COX-2/人前列腺素E₂(PGE₂)通路可增加乳腺癌中雌激素合成酶的活性, 从而提高乳腺癌中雌激素水平, 促进乳腺癌的发生发展^[5]。2010年新的研究报道开始关注PGE₂对乳腺癌细胞中细胞色素P450(CYP)1B1(CYP1B1)的调节表达^[6]。CYP1B1属于细胞色素P450超基因家族中CYP1B亚族的唯一成员, 主要功能是催化雌激素的羟基化, 代谢产生基因毒性致癌物。由此提示, COX-2/PGE₂通路与雌激素代谢酶(CYP1B1)致癌效应间存在重要关系。

维生素D的抗炎-抗癌效应与其对COX-2/PGE₂通路负性调节影响CYP1B1作用机制可能有关。本研究以不同人来源的乳腺癌组织标本和雌激素受体 α (ER α)阳性乳腺癌细胞系MCF-7为研究对象, 首先检测人乳腺癌组织中COX-2、p-ER α 和CYP1B1蛋白表达, 分析其相关性; 进而应用维生素D的体内活性代谢产物——1,25-二羟基维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]处理MCF-7细胞, 检测COX-2、PGE₂、p-ERK、p-ER α 和CYP1B1表达的变化, 观察细胞增殖细胞周期转化的效应, 探讨在乳腺癌发生发展中, 1,25(OH)₂D₃通过COX-2/PGE₂通路影响

CYP1B1的作用机制。

1 材料和方法

1.1 组织实验

1.1.1 乳腺癌组织标本来源及处理 收集2010年9~12月重庆医科大学附属第一医院手术切除的乳腺癌组织标本42例, 均为女性, 年龄36~75岁, 平均(52±9.9)岁。病理分型按WHO分类标准, 经临床病理医师诊断为乳腺浸润性导管癌35例, 乳腺黏液腺癌3例, 乳腺导管内癌2例, 恶性肌上皮瘤和髓样癌各1例。组织标本经甲醛常规固定, 石蜡包埋, 4 μ m厚连续切片, 裱于经多聚赖氨酸处理的载玻片上, 60℃烤箱烤片过夜, 防止脱片。

1.1.2 免疫组织化学法检测乳腺癌组织中COX-2、p-ER α (ser118)和CYP1B1的表达 用免疫组织化学SABC法检测乳腺癌组织中COX-2、p-ER α (ser118)和CYP1B1的表达, 检测前对组织切片常规进行热抗原修复, 使用PBS代替一抗作为阴性对照。CYP1B1兔抗人多克隆抗体、p-ER α (ser118)兔抗人多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司, COX-2兔抗人多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。SABC免疫组化试剂盒购自于武汉博士德生物工程有限公司, 按试剂盒说明书进行检测。

1.1.3 免疫组化结果判定^[7] COX-2和CYP1B1均以细胞质中出现棕黄色颗粒作为阳性反应, p-ER α (ser118)则以细胞核中出棕黄色颗粒作为阳性反应。随机选择5个高倍镜视野($\times 400$)进行判断。(1)细胞染色强度: 无染色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。(2)细胞染色阳性百分率: 无阳性细胞即阴性为0分; 阳性细胞 $\leq 10\%$ 为1分, 11%~50%为2分, 51%~75%为3分, $> 75\%$ 为4分。以上两个得分的乘积作为评分标准, ≥ 3 分为阳性结果, < 3 分为阴性结果。

1.2 细胞实验

1.2.1 材料 乳腺癌细胞MCF-7由重庆医科大学病理生理学教研室提供。无酚红DMEM干粉培养基(美国SAFC Bioscience公司), 新生牛血清(美国Gibco公司)。四甲基偶氮唑盐(MTT)、1,25(OH)₂D₃(美国Sigma公司)。CYP1B1兔抗人多克隆抗体、p-ER α (ser118)兔抗人多克隆抗体、ERK兔抗人多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)。

COX-2 兔抗人多克隆抗体、p-ERK1/2 兔抗人多克隆抗体、ER α 兔抗人多克隆抗体、 β -actin 兔抗人多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG、PGE2 ELISA 检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)。Western 荧光检测试剂 BeyoECL、Cy3 标记山羊抗兔 IgG(碧云天生物技术有限公司)。SABC 免疫组化试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。RT-PCR 试剂盒(宝生物工程技术有限公司)。自动酶标仪、PAGE 凝胶电泳仪、垂直电泳槽、PCR 仪、电泳凝胶图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 去雌激素新生牛血清的制备^[8] 分别称取 5 g 活性炭和 500 mg 葡聚糖 T40,用去离子水定容至 100 ml,充分搅拌 1 h 后,1 000 \times g 离心 10 min,弃上清,往沉淀物中加入 100 ml 新生牛血清,在 56 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌混匀 30 min,1 000 \times g 离心 20 min,取上清液。连续处理 2 次以除去血清中雌激素。处理后的血清用金属滤器(0.22 μ m)过滤除菌后,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 细胞培养 乳腺癌细胞 MCF-7 常规复苏,培养于含 10% 去雌激素新生牛血清、1 \times 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的无酚红高糖 DMEM 培养液中。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度的孵箱中培养。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整细胞密度为 2 \times 10⁴ 个/ml,接种于 3 块 96 孔培养板中。每孔接种细胞悬液 200 μ l;设置试剂对照组、未加药细胞组、1,25(OH)₂D₃ 组(分为 1、10、50、100 nmol/L 4 个浓度);细胞接种 24 h 后加药,每组设 5 个平行孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度的孵箱内培养。分别培养 24、48、72 h 后弃上清,每孔加入 20 μ l 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 及 200 μ l 无血清无酚红 DMEM 培养液继续培养 4 h,取出后 200 \times g 离心 10 min,弃上清,每孔加 200 μ l DMSO 于摇床上振动 10 min,用酶标仪测定波长 570 nm 的光密度值(D_{570})。实验重复 3 次。计算药物在不同浓度、不同作用时间对 MCF-7 细胞的抑制率。抑制率(%)=1-(加药组平均 D_{570} /未加药组 D_{570}) \times 100%。根据抑制率确定后续实验所用药物浓度。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 收集对照组和 1,25(OH)₂D₃ 实验组细胞(细胞接种 24 h 后加药,培养 72 h)经预冷的 PBS 离心洗涤 2 次,以 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 70%乙醇固定 24 h。PBS 洗涤 1 次,然后加 20

mg/L 核糖核酸酶 A(RNaseA),37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,再加 100 mg/L 碘化丙啶(PI),4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,流式细胞仪测定荧光强度(激光波长为 488 nm)。采用 MODFIT2.0 分析软件进行细胞周期 DNA 含量分析。实验重复 3 次。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞 COX-2 mRNA 的表达 按照 TRIzol 试剂说明书方法提取 MCF-7 对照组及 1,25(OH)₂D₃ 实验组(细胞接种 24 h 后加药,培养 72 h)细胞总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度,按反转录试剂盒说明书先反转录合成第 1 条 cDNA,再以等量的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。COX-2 引物:上游 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3',下游 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3',扩增产物长度 305 bp; β -actin 引物:上游 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3',下游 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3',扩增产物长度为 564 bp。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,95 $^{\circ}$ C 50 s,58 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。取 5 μ l PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,GoodView 显色,Quantity One 软件分析各扩增条带产物的含量,以目的条带的灰度值/ β -actin 条带的灰度值表示。实验重复 3 次。

1.2.7 ELISA 法定量检测 MCF-7 细胞培养液中 PGE2 水平 接种 MCF-7 细胞于 6 孔板中,5 \times 10⁵ 个/孔,24 h 细胞贴壁后换液。对照组加完全培养液,实验组加含所需浓度药物的培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度的孵箱内培养 72 h。收集细胞培养液,1 000 \times g 离心 10 min 后收集上清。将 50 μ l 标准品或样品分别加入相应孔中,按 PGE2 ELISA 试剂盒说明书步骤进行实验。于自动酶标仪上测定 450 nm 处 D 值。实验重复 3 次,每次各组设 3 个复孔。

1.2.8 蛋白质印迹分析检测细胞 COX-2、p-ERK1/2、ERK、p-ER α (ser118)、ER α 和 CYP1B1 的表达 常规培养细胞,传代接种 24 h 后实验组加药,继续培养 72 h,分别收集对照组与实验组细胞约 5 \times 10⁶ 个,用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白。用 Bradford 法测定蛋白浓度。行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PVDF 膜。8% 脱脂牛奶室温封闭 4 h 后与 1:100 兔抗人 COX-2 抗体、1:100 兔抗人 p-ERK1/2 抗体、1:500 兔抗人 ERK 抗体、1:100 兔抗人 ER α 抗体、1:200 兔抗人 p-ER α (ser118) 抗体、1:200 兔抗人 CYP1B1 抗体孵育,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜后加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标

记的羊抗兔 IgG 37℃ 孵育 1 h。ECL 显色,用 Bio-Rad 图像分析系统拍照,Quantity One 软件分析蛋白相对含量。实验重复 3 次。

1.2.9 免疫荧光检测细胞 COX-2、p-ER α (ser118) 和 CYP1B1 的表达 取对数生长期细胞,制备 5×10^4 个/ml 的细胞悬液进行爬片。设置对照组和加药组(细胞接种 24 h 后加药,培养 72 h),予 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min,5% BSA 封闭液 37℃ 封闭 30 min,分别滴加 1:25 的 COX-2 抗体、p-ER α (ser118) 抗体和 CYP1B1 抗体,4℃ 避光孵育过夜,再分别滴加 1:50 的 Cy3 或 FITC 标记的羊抗兔 IgG,37℃ 避光孵育 30 min,COX-2 和 CYP1B1 组加 DAPI 染色液室温放置 3 min,PBS 洗 3 次,抗荧光淬

灭封片液封片,荧光显微镜下观察,用 Image-pro Plus 6.0 软件计算光密度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关分析采用 Spearman 相关性检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 人乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α (ser118) 和 CYP1B1 的表达 免疫组化染色结果见图 1。42 例人乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α (ser118) 和 CYP1B1 的阳性表达率分别为 78.6% (33/42)、66.7% (28/42) 和 73.8% (31/42)。

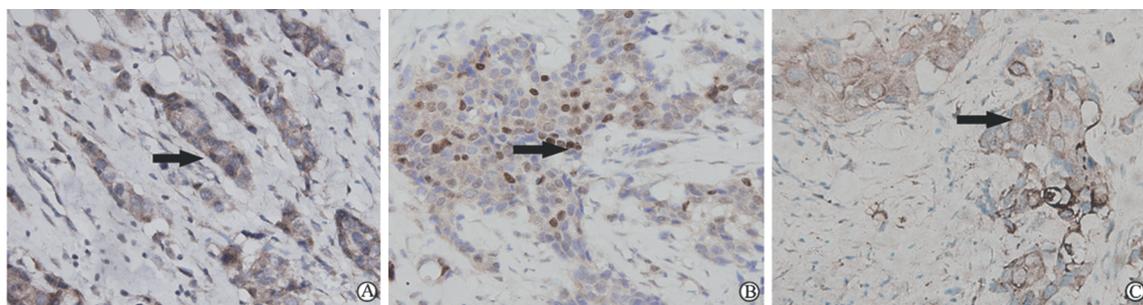


图 1 乳腺癌组织中 COX-2(A)、p-ER α (ser118,B) 和 CYP1B1(C) 的表达

Fig 1 Expression of COX-2(A), p-ER α (ser118,B) and CYP1B1(C) in primary breast carcinomas(SABC method)

Arrows indicate positive staining of the cell cytoplasm or nucleus. Original magnification: $\times 400$

2.2 乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α (ser118) 及 CYP1B1 表达间的相关性 42 例人乳腺癌组织中 COX-2 阳性表达 33 例[其中 p-ER α (ser118) 阳性表达 27 例,CYP1B1 阳性表达 28 例],经 Spearman 相关分析显示,COX-2 表达与 p-ER α (ser118)、CYP1B1 表达

均成显著正相关($r=0.615, P=0.000; r=0.481, P=0.001$)。p-ER α (ser118) 阳性表达 28 例(其中 CYP1B1 阳性表达 24 例),经 Spearman 相关分析显示,p-ER α (ser118) 表达与 CYP1B1 表达呈显著正相关($r=0.383, P=0.012$)。见表 1。

表 1 乳腺癌组织中 COX-2、p-ER α (ser118) 及 CYP1B1 表达间的相关性

Tab 1 Correlation of COX-2, p-ER α (ser118) and CYP1B1 protein expression in breast cancer tissues

Item		CYP1B1				p-ER α (ser118)			
		+	-	<i>r</i>	<i>P</i>	+	-	<i>r</i>	<i>P</i>
COX-2	+	28	5	0.481	0.001	27	6	0.615	0.000
	-	3	6			1	8		
p-ER α (ser118)	+	24	4	0.383	0.012				
	-	7	7						

2.3 1,25(OH)₂D₃ 对 MCF-7 细胞增殖的影响 MTT 实验结果(图 2)显示,1,25(OH)₂D₃ 作用的各实验组细胞生长受到抑制,随浓度的增加,抑制率增大;随时间延长,抑制率也增大,呈时效、量效依赖关系。不同浓度和不同作用时间之间的抑制率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。根据抑制率,确定以 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ 用于后续实验。

2.4 1,25(OH)₂D₃ 对 MCF-7 细胞周期的影响 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ 作用 MCF-7 细胞 72 h,与对照组比较,实验组细胞周期中 G₀/G₁ 期细胞比例增加,S 期和 G₂/M 期细胞比例明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞周期阻滞发生在 G₀/G₁ 期(表 2、图 3)。

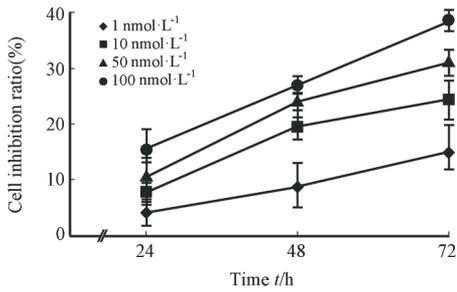


图 2 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

Fig 2 Anti-proliferative effect of 1,25(OH)₂D₃ on MCF-7 cells

$P < 0.05$ between different concentrations and treatment periods; $n = 15$, $\bar{x} \pm s$

表 2 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞周期的影响
Tab 2 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on MCF-7 cell cycle progression

Group	$n = 3, \bar{x} \pm s, \%$		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	66.65 ± 0.77	22.94 ± 1.79	10.40 ± 2.57
1,25(OH) ₂ D ₃	87.64 ± 1.23*	7.49 ± 1.98*	4.87 ± 2.11*

* $P < 0.05$ vs control group

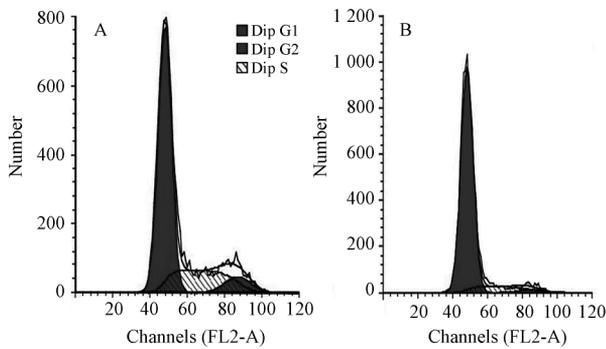


图 3 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig 3 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on MCF-7 cell cycle

A: Control group; B: 1,25(OH)₂D₃ group

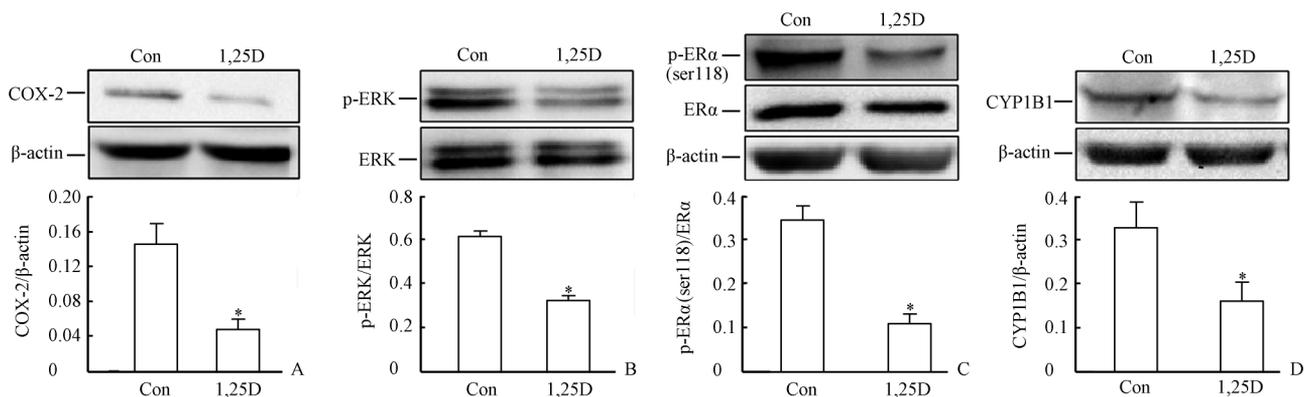


图 5 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞 COX-2、p-ERK、p-ERα(ser118) 和 CYP1B1 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on protein expression of COX-2, p-ERK, p-ERα(ser118) and CYP1B1 in MCF-7 cells

Con: Control; 1,25D: 1,25(OH)₂D₃. A: COX-2; B: p-ERK; C: p-ERα(ser118); D: CYP1B1. * $P < 0.05$ vs control group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞 COX-2 mRNA 表达的影响 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃作用 MCF-7 细胞 72 h, COX-2 mRNA 表达减少。对照组 COX-2 mRNA 为 0.48 ± 0.06, 实验组为 0.28 ± 0.03, 与对照组比较, 1,25(OH)₂D₃ 实验组 COX-2 mRNA 表达下降了 41.67%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

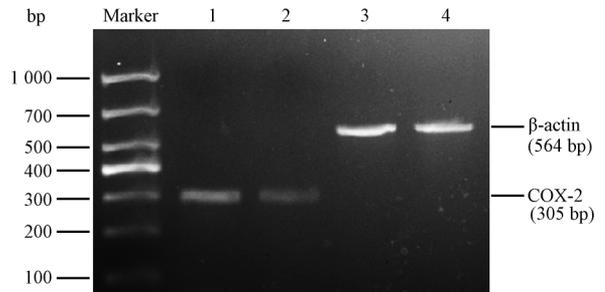


图 4 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

Fig 4 Effect of 1,25(OH)₂D₃ on expression of COX-2 mRNA in MCF-7 cells

1,3: Control group; 2,4: 1,25(OH)₂D₃ group

2.6 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞培养上清液中 PGE₂ 表达的影响 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃作用 MCF-7 细胞 72 h 后, 细胞培养上清液中 PGE₂ 的水平减少。实验组 PGE₂ 浓度与对照组比较差异有统计学意义 [(2.649 ± 0.158) ng/ml vs (4.646 ± 0.467) ng/ml, $P = 0.002$]。

2.7 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞 COX-2、p-ERK、p-ERα(ser118) 和 CYP1B1 蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析检测结果显示, 100 nmol/L 1,25(OH)₂D₃作用 MCF-7 细胞 72 h 后, 与对照组相比 COX-2、p-ERK、p-ERα(ser118)、CYP1B1 蛋白的表达均减少 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.8 免疫荧光检测结果 免疫荧光检测结果(图6)显示 COX-2(Cy3 标记)与 CYP1B1 蛋白(FITC 标记)在 MCF-7 细胞胞质中表达, p-ER α (ser118)蛋白(Cy3 标记)在 MCF-7 细胞胞核中表达。与对照组相比, 1,25(OH)₂D₃作用细胞 72 h 后, COX-2[47.37±8.39 vs 106.18±15.85(对照)], CYP1B1[20.64±3.23 vs 51.03±8.87(对照)]及 p-ER α (ser118)[77.18±11.92 vs 170.35±30.67(对照)]的荧光强度减弱, 差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

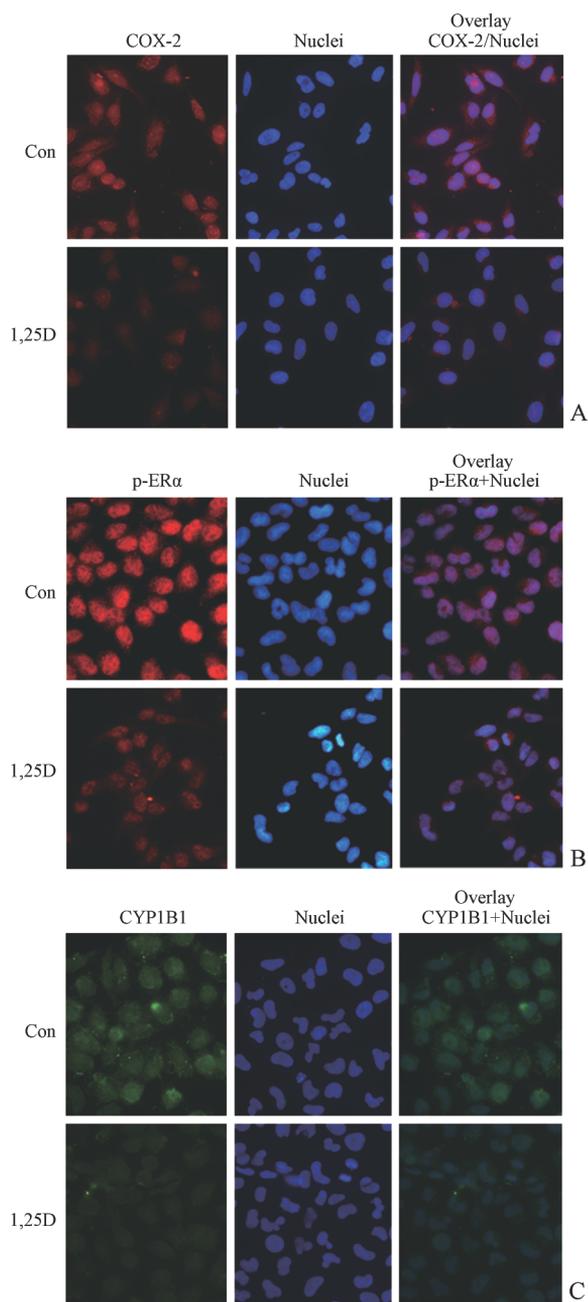


图6 免疫荧光检测 1,25(OH)₂D₃对 MCF-7 细胞 COX-2、p-ER α (ser118)及 CYP1B1 蛋白表达的影响

Fig 6 Immunofluorescence analysis of effect of 1,25(OH)₂D₃ on COX-2, p-ER α (ser118) and CYP1B1 protein expression in MCF-7 cells

Con: Control; 1,25D: 1,25(OH)₂D₃. A: COX-2; B: p-ER α (ser118); C: CYP1B1. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

炎症是肿瘤的第七大特征^[9]。作为炎症反应中的关键启动因子, COX-2 在受到炎性细胞因子、生长因子、癌基因等刺激下可快速诱导表达, 在炎症反应及肿瘤的发生发展中起重要作用。COX-2 催化产生 PGE2 介导多种信号级联反应是参与肿瘤恶性进展的重要通路。已有研究证实, COX-2/PGE2 在乳腺癌中高表达, 且与负责合成雌激素的芳香化酶、17 β -羟基类固醇脱氢酶(17 β -HSD)等酶的表达呈正相关^[10]。对于雌激素依赖性的乳腺癌, COX-2 调节雌激素合成相关酶的表达对乳腺癌中高水平雌激素的产生起到一定作用。Han 等^[6]最近研究发现, 在 ER 阳性乳腺癌细胞中, PGE2 可通过信号级联反应使 ER α 多位点磷酸化, 磷酸化激活的 ER α 作用于 CYP1B1 启动子上的雌激素受体反应元件(ERE), 可转录激活雌激素代谢酶 CYP1B1 的表达。本研究选用 ER α 磷酸化重要位点为丝氨酸第 118 位。我们发现, 在人乳腺癌组织中, COX-2、p-ER α 、CYP1B1 均呈阳性表达, 三者之间存在正相关关系, 显示在人体乳腺癌组织中可能存在经 COX-2/PGE2 通路调控 CYP1B1 的机制, 并且在人乳腺癌来源的细胞系 MCF-7 中予以证实。COX-2/PGE2 通路调节雌激素代谢酶 CYP1B1 表达水平势必增强雌激素在乳腺癌代谢后的致癌效应, 可能是乳腺癌发生发展的重要机制, 值得关注。

维生素 D 是一种类固醇激素, 在体内以其活性代谢产物 1,25(OH)₂D₃ 发挥生物学效应。1,25(OH)₂D₃ 的抗炎-抗癌效应与 COX-2/PGE2 通路有关。Krishnan 等先后在人前列腺癌细胞^[11]及乳腺癌细胞^[12]的研究中发现 1,25(OH)₂D₃ 下调 COX-2 的转录及翻译水平, 且伴随癌细胞 PGE2 水平的下降及其所介导的多系列信号级联反应的失活^[13]。本研究发现, 在人乳腺癌来源细胞株 MCF-7 中, 1,25(OH)₂D₃ 在基因和蛋白水平下调 COX-2 的表达, 细胞培养上清液中 PGE2 水平相应降低, 与上述报道一致。MTT 实验显示 1,25(OH)₂D₃ 具有抑制 MCF-7 细胞增殖的作用, 在 1~100 nmol/L 的浓度范围, 随作用时间的延长, 抑制细胞增殖的作用增强, 呈时效、量效依赖关系, MCF-7 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。

PGE2 是一种能够刺激癌细胞生长的炎症因子, 其激活癌细胞生长效应的方式多样, PGE2 可由自分泌或旁分泌方式作用于同种细胞或邻近周围组织其他类型的细胞, 与细胞膜上的受体结合, 经 G 蛋白偶联途径、核内过氧化物酶增殖体激活受体(PPAR)、RAS/MAPK、PI3K/AKT 等信号通路刺

激癌细胞生长^[14]。MAPK 家族中的 ERK 通路活化是促进肿瘤细胞增殖中具有代表性的重要信号转导机制。我们发现,在 MCF-7 细胞,伴随着 1,25(OH)₂D₃ 下调 PGE2 水平,磷酸化 ERK 蛋白水平亦下降,显示 MAPK 通路活性受抑。ER α 的丝氨酸位点磷酸化与该受体转录激活功能密切相关,它不仅可在雌激素作用下磷酸化,亦可通过激活 ERK、AKT、PKA 等激酶通路^[6],分别致其 N 端第 118 位、第 167 位和第 305 位磷酸化激活。本研究中对细胞培养血清进行了去雌激素处理并使用无酚红培养液,排除雌激素和酚红的类雌激素效应对 ER α 的磷酸化作用;实验结果显示,1,25(OH)₂D₃ 抑制 PGE2 表达水平及其下游 ERK 通路的同时,使 p-ER α (ser118) 蛋白水平降低。由此可见,1,25(OH)₂D₃ 可能通过抑制 COX-2/PGE2 通路,降低 ERK 活性,进而抑制 ER α 转录因子活性,导致其对 CYP1B1 的负性调节。

CYP1B1 为细胞色素 P450 酶家族成员,是雌激素在体内代谢过程中一种关键的肝外酶。它在促进肿瘤发生发展及肿瘤耐药中起着重要作用:通过催化雌二醇(E2)在 C4 位点羟化,转变为 4-OH-E2,该代谢产物经进一步氧化,变为雌二醇 3,4-醌,后者可与 DNA 中的嘌呤反应形成脱嘌呤的加合物,导致 DNA 突变^[15];此外,在氧化形成雌二醇 3,4-醌的过程中产生的氧自由基也可对 DNA 造成损伤,诱发癌变。除代谢产生 DNA 损伤产物外,CYP1B1 尚可激活和代谢其他致癌物质,并使多种抗癌药物代谢失活而产生肿瘤耐药^[16]。文献报道 CYP1B1 基因的表达主要是由磷酸化的 ER α 所激活^[17]。由于 CYP1B1 在许多肿瘤组织中特异性高表达,使其可能作为肿瘤预防、诊断以及治疗的理想靶点。

总之,本研究认为在 ER 阳性乳腺癌细胞中,COX-2/PGE2 通路可能是 CYP1B1 表达的重要调控机制;1,25(OH)₂D₃ 可通过 COX-2/PGE2 通路抑制 p-ERK 和 p-ER α 活性水平,减少 CYP1B1 表达,从而抑制肿瘤细胞增殖。1,25(OH)₂D₃ 对 CYP1B1 的抑制作用,在其抗乳腺癌效应中具有重要意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
 [2] Bertone-Johnson E R. Vitamin D and breast cancer[J]. Ann Epidemiol, 2009, 19: 462-467.
 [3] Bertone-Johnson E R, Chen W Y, Holick M F, Hollis B W,

Colditz G A, Willett W C, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14: 1991-1997.
 [4] Krishnan A V, Swami S, Feldman D. Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 121(1-2): 343-348.
 [5] Subbaramaiah K, Hudis C, Chang S H, Hla T, Dannenberg A J. EP2 and EP4 receptors regulate aromatase expression in human adipocytes and breast cancer cells. Evidence of a BRCA1 and p300 exchange[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 3433-3444.
 [6] Han E H, Kim H G, Hwang Y P, Song G Y, Jeong H G. Prostaglandin E2 induces CYP1B1 expression via ligand-independent activation of the ER α pathway in human breast cancer cells[J]. Toxicol Sci, 2010, 114: 204-216.
 [7] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6: 229-231.
 [8] Han D, Denison M S, Tachibana H, Yamada K. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25: 1263-1267.
 [9] Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability[J]. Carcinogenesis, 2009, 30: 1073-1081.
 [10] Gunnarsson C, Jansson A, Holmlund B, Ferraud L, Nordenskjöld B, Rutqvist L E, et al. Expression of COX-2 and steroid converting enzymes in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 16: 219-224.
 [11] Krishnan A V, Shinghal R, Raghavachari N, Brooks J D, Peehl D M, Feldman D. Analysis of vitamin D-regulated gene expression in LNCaP human prostate cancer cells using cDNA microarrays[J]. Prostate, 2004, 59: 243-251.
 [12] Krishnan A V, Swami S, Peng L, Wang J, Moreno J, Feldman D. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy[J]. Endocrinology, 2010, 151: 32-42.
 [13] Moreno J, Krishnan A V, Swami S, Nonn L, Peehl D M, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 7917-7925.
 [14] Greenhough A, Smartt H J, Moore A E, Roberts H R, Williams A C, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment[J]. Carcinogenesis, 2009, 30: 377-386.
 [15] Cavalieri E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, et al. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1766: 63-78.
 [16] Bruno R D, Njar V C. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development[J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 5047-5060.
 [17] Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M, Yokoi T. Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor[J]. Cancer Res, 2004, 64: 3119-3125.