

依西美坦与低剂量甲氨蝶呤对依西美坦耐药人乳腺癌细胞的协同效应及逆转耐药机制

居伶俐¹, 袁媛², 潘跃银¹

摘要 目的 研究依西美坦 (EXE) 与低剂量甲氨蝶呤 (MTX) 对依西美坦耐药人乳腺癌 MCF-7 细胞 (MCF-7/EXE) 的增殖抑制作用及意义。方法 使用 MTT 法检测 EXE 与低剂量 MTX 单药和联合给药对 MCF-7/EXE 细胞的增殖抑制作用, 计算依西美坦与低剂量甲氨蝶呤联合给药时的联合指数 (CI), 评价两药间的相互作用。流式细胞术检测 IC₅₀ 浓度药物 EXE 组 (120 μmol/L)、低剂量 MTX 组 (60 nmol/L)、EXE + MTX 组处理后的 MCF-7/EXE 细胞周期变化。荧光染色观察单药及联合作用对细胞凋亡的影响。Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2、AKT、P-AKT、COX-2 蛋白的表达情况。结果 MTT 法表明, 与单药作用相比, 联合治疗明显降低 MCF-7/EXE 细胞的活性 (CI < 0.9)。此外, EXE 和低剂量 MTX 的联合使用表现对细胞增殖的协同抑制作用, 细胞周期显著阻滞于 S 期, Western blot 法显示联合组与对照组或单个药物组相比对 P-AKT、Bcl-2、COX-2 蛋白的表达有更强的抑制作用。结论 EXE 与低剂量 MTX 联合使用时对 MCF-7/EXE 细胞产生协同抑制作用, 可逆转耐药。

关键词 依西美坦; 甲氨蝶呤; 耐药细胞; 乳腺癌

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1404-05

2014-06-13 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金重点项目 (编号: KJ2012A157); 安徽省科技攻关项目 (编号: 13010422140); 安徽省年度重点科技计划项目 (编号: 12070403072)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 233022

²合肥市滨湖医院中心实验室, 合肥 230601

作者简介: 居伶俐, 女, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yueyinpan@gmail.com

在激素受体阳性 (ER+) 乳腺癌患者中, 芳香化酶抑制剂 (AIs) 表现出很好的疗效^[1], 有研究^[2]显示 AIs 在绝经后激素反应性乳腺癌妇女的辅助内分泌治疗和解救治疗效果优于他莫昔芬。当前治疗绝经后雌激素依赖性乳腺癌患者以 AIs 作为一线治疗, 但是仍然有一半的 ER+ 乳腺癌患者治疗失败^[3]。同时, 随着药物治疗的深入, AIs 的耐药也逐渐显现。有研究^[4]表明在多种耐药癌细胞中, COX-2 过表达是诱导多药耐药基因表达的因素, 继而产生耐药。目前 COX-2 抑制剂作为抗炎、抗风湿治疗药物, 也用于抗肿瘤治疗, 虽然先前研究^[5]显示选择性 COX-2 抑制剂取得了良好的临床疗效, 但是由于存在心血管毒性限制了其长期服用。甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 作为一种抗肿瘤代谢药也可用于抗炎治疗类风湿 (rheumatoid, RA), 其机制尚不明确, 有研究^[6]显示低剂量的 MTX 能够抑制体内 COX-2 的水平治疗 RA, 且长期使用是安全的, 肿瘤的内分泌治疗一般也是需要长期服药, 所以肿瘤的内分泌治疗与低剂量的 MTX 联合使用对防止内分泌治疗耐药可能有效, 该研究将探讨 AIs 耐药机制及低剂量的 MTX 如何逆转耐药。

1 材料与方法

1.1 实验材料 DMEM 培养液、胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、MTT、碘化丙啶 (PI)、RNase A、P-AKT 和 AKT 购于美国 Sigma 公司; Bcl-2、β-actin 抗体购于北京中杉金桥生物技术

miR-107 mimics or negative control using Lipofectamine 2000. After transfection, the expression level of miR-107 was tested by qRT-PCR. Cell proliferation was tested by methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. Cell cycle was detected by flow cytometry. The expression level of CDK6 protein was measured by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the expression level of miR-107 in miR-107 mimics group was significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the proliferation of HepG2 cells was inhibited ($P < 0.05$), G0/G1 phase cells were increased ($P < 0.05$), and the expression level of CDK6 protein was decreased ($P < 0.05$) in miR-107 mimics group. **Conclusion** These results demonstrate that miR-107 inhibits the proliferation and induces G0/G1 phase arrest in HepG2 cells, which may be related to the inhibition of CDK6 expression.

Key words hepatocellular carcinoma; miR-107; proliferation; cell cycle; CDK6

有限公司;COX-2 购于 Bioworld 科技股份有限公司;免疫印迹化学发光剂 ECL 购于美国 Millipore 公司。依西美坦耐药人乳腺癌细胞株 (MCF-7/EXE) 由安徽医科大学第一附属医院实验室研究时构建^[7];依西美坦(exemestane, EXE)为辉瑞公司惠赠;MTX 由上海信谊药厂有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7/EXE 细胞株于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂、90% 相对湿度的培养箱中培养,细胞贴壁生长 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法 MCF-7/EXE 用胰酶消化后,用 DMEM 培养液吹打成细胞悬液均匀接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 待细胞完全贴壁后,实验组加入 6 组不同浓度梯度 EXE 12.5~400.0 μmol/L 与 MTX 10~320 nmol/L 浓度依次倍比稀释,分别测得各自的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值,联合组则按照 6 组倍比稀释浓度梯度的 EXE,每孔 100 μl,再加入低浓度 MTX (60 nmol/L),每 100 μl 用培养液稀释的药物,同时设细胞对照组(含培养基和细胞)及空白对照组(含培养基无细胞),及 MTX 组(60 nmol/L)培养箱孵育 72 h。加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续在培养箱培养 4 h,取出 96 孔板吸去上清液,加入 DMSO 每孔 150 μl,在摇床上震动摇匀 10 min,在酶标仪 490 nm 的波长下测得各孔 OD 值。细胞抑制率(%) = [1 - (加药组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)] × 100%。采用 SPSS 计算单药处理组 IC₅₀值和 CompuSyn 软件计算联合组方的联合指数(combination index, CI)值。通过实验数据与查阅相关文献^[8-9],以治疗 RA 的剂量作为参考,本实验以 60 nmol/L 作为低剂量标准。对于后期细胞周期检测,Western blot 法及荧光染色均采用 EXE (120 μmol/L)、MTX (60 nmol/L) 浓度作为处理细胞的单药或联合组用药浓度。

1.2.3 细胞周期的测定 取对数生长期的 MCF-7/EXE 细胞调整细胞数为 1 × 10⁴ 个/ml 分别接种于 6 孔板中,分为 4 组:对照组、EXE 组(120 μmol/L), MTX 组(60 nmol/L)及 EXE + MTX 联合组,待细胞达 90% 融合时收集细胞,离心 1 000 r/min 5 min 沉淀后用 PBS 重悬细胞,置于 70% 的冰酒精中固定,然后加入 PI 50 mg/L 和 RNase A 10 mg/L 避光 30

min,置流式细胞仪检测。

1.2.4 Annexin V-FITC、PI 荧光染色观察细胞凋亡

取对数生长期细胞,以 1 × 10⁵ /ml 的浓度接种于 6 孔板,次日细胞贴壁后加入 3 组药物,分别为低剂量 MTX 组(60 nmol/L),EXE 组(120 μmol/L)和 EXE + MTX 联合组(EXE 120 μmol/L, MTX 60 nmol/L)分别作用 72 h 诱导细胞发生凋亡,并设立对照组,作用时间结束后, PBS 洗涤两遍,加入配好的荧光试剂[Binding Buffer、Annexin V-FITC、PI; 比例为 100 : 1 : 1],均匀覆盖 6 孔板底面,室温避光反应 5 min。于荧光显微镜下观察拍照,Annexin V-FITC 荧光信号为绿色,PI 荧光信号为红色。

1.2.5 Western blot 法检测 Bcl-2、COX-2、AKT 和 P-AKT 蛋白表达 收集药物实验的细胞新鲜样本,BCA 法蛋白定量,加入 Loading Buffer 后 95 °C 变性 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,保存于 -80 °C 冰箱中,用于蛋白表达水平和蛋白生物活性检测。将蛋白样品(50 μg/孔)加入 10% 浓度的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分离。电泳 220 V 120 min 分离完毕后,切胶,制三文治盒。进行转膜,将样品蛋白电转至 PVDF 膜上。后经 5% 脱脂奶粉封闭 4 °C 一抗(Bcl-2、COX-2、AKT 和 P-AKT 蛋白,1 : 500)孵育过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 10 000)二抗常温孵育 1 h, TBST 洗膜后,然后转入暗室加 ECL 发光液,化学发光法曝光感光底片,显影定影洗涤。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验重复 3 次,多组均数间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 单药对 MCF-7/EXE 细胞的体外增殖抑制作用 两药物单药作用于 MCF-7/EXE 细胞 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 EXE: (120.37 ± 8.33) μmol/L, MTX: (96.33 ± 2.26) nmol/L,各药物对 MCF-7/EXE 细胞增殖的抑制作用随着药物浓度的增加而增强,具有浓度依赖性,见图 1。

2.2 两药联合对 MCF-7/EXE 细胞的作用 根据以上单药组对细胞的生长抑制曲线,由此得出 EXE 的 IC₅₀ 约为 120 μmol/L, MTX 的 IC₅₀ 约为 100 nmol/L,本次测联合作用时,采用各梯度浓度 EXE 组与低剂量 MTX 组(60 nmol/L)联合作用于 MCF-7/EXE 细胞的各组的 CI 值,MTT 法检测 EXE + MTX 表现为协同作用(CI < 0.9),见图 2。

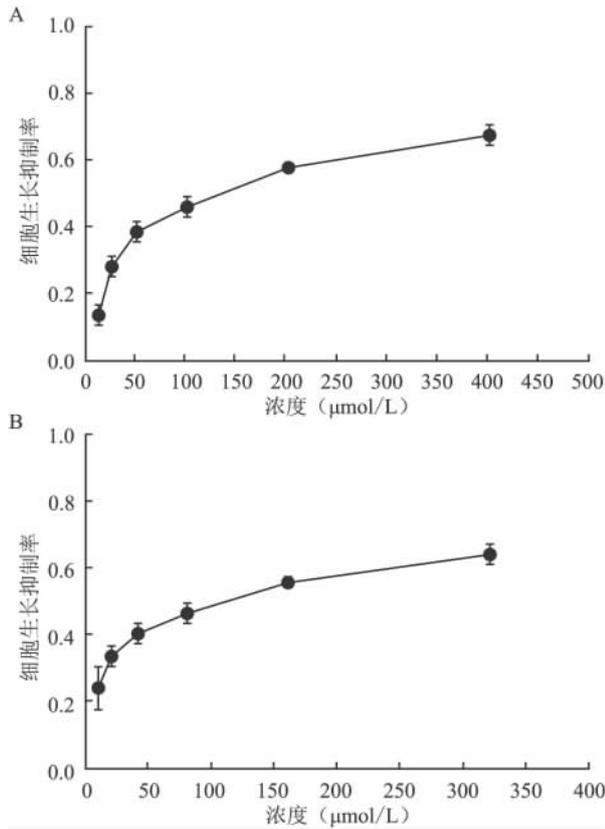


图1 MTT法检测EXE、MTX对MCF-7/EXE细胞的体外抑制作用
A:EXE;B: MTX

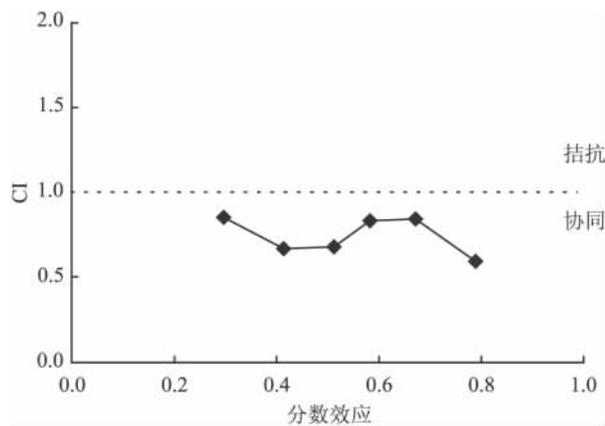


图2 MTT法检测EXE与低剂量MTX对MCF/EXE细胞协同效应(CI<0.9)

2.3 单药及联合用药对MCF-7/EXE细胞周期的影响 EXE组(120 μmol/L)与MTX组(60 nmol/L)分别阻滞细胞于G₀/G₁期和S期,联合作用时S期明显阻滞,结果显示联合组与单药组及对对照组相比MCF-7/EXE细胞S期阻滞更显著(F=51.956, P<0.05),G₀/G₁期下降,G₂/M期改变不明显。见表1、图3。

表1 EXE及低剂量MTX单药及联合处理后MCF-7/EXE细胞周期的变化(n=3,% $\bar{x}\pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	57.02 ± 0.92	29.42 ± 3.19	13.56 ± 2.30
EXE	70.85 ± 2.19	22.13 ± 2.09*	7.01 ± 0.16
MTX	49.33 ± 1.21	36.33 ± 3.11*	14.35 ± 2.40
EXE + MTX	39.65 ± 0.96	49.54 ± 2.69*	10.81 ± 1.75

与对照组比较:* P<0.05

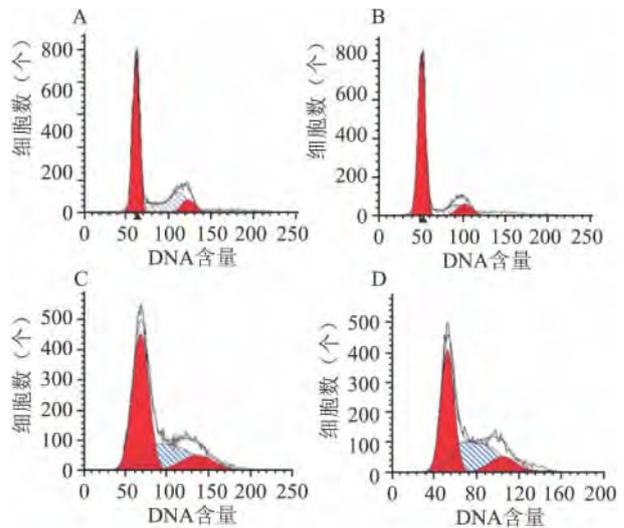


图3 流式细胞术检测不同处理方式72h细胞的周期图
A:对照组; B:EXE单药组;C:低剂量MTX单药组;D:联合组

2.4 EXE与MTX单药及联合使用对MCF-7/EXE细胞凋亡作用 EXE(120 μmol/L)及低剂量MTX(60 nmol/L)浓度作用于MCF-7/EXE细胞72h后经Annexin V-FITC和PI荧光染色,观察到细胞凋亡率不同,EXE+MTX组较EXE、MTX单药组细胞凋亡增多,见图4。

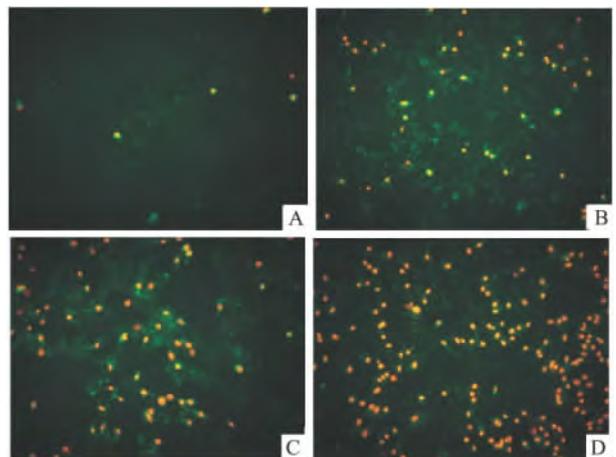


图4 荧光显微镜下细胞凋亡 ×400
A:对照组; B:EXE单药组;C:低剂量MTX单药组;D:联合组

2.5 Western blot 法检测 EXE (120 $\mu\text{mol/L}$), MTX (60 nmol/L) 单药组及两药联合均可以抑制 P-AKT、Bcl-2、COX-2 蛋白水平的表达,与对照组及单药组相比,联合组抑制作用更明显。见图 5。

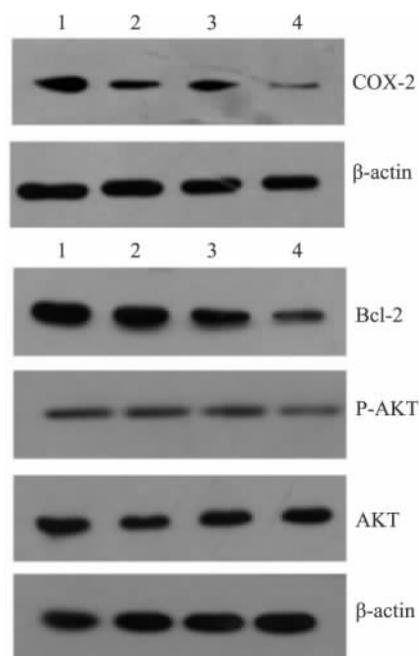


图 5 EXE 和(或)MTX 对 MCF-7/EXE 细胞中 COX-2、P-AKT、AKT、Bcl-2 表达的影响
1:对照组;2:EXE 单药组;3:低剂量 MTX 单药组;4:联合组

3 讨论

Mello et al^[6] 用低剂量的 MTX 治疗 RA 患者,评估其对血浆中 COX-1 /COX-2 水平的影响,结果显示同健康对照者相比 MTX 能够明显降低患者血浆中 COX-2 的水平。研究^[10] 表明 COX-2 表达的失调是乳腺癌形成的重要病理生理过程,同时显示乳腺癌组织中 COX-2 mRNA 和蛋白表达水平较正常组织中明显提高。

研究^[11] 表明 COX-2 和芳香化酶存在正相关性。正是这种相关性,使得乳腺癌中 COX-2 的产物 PGE2 可以通过 G 蛋白偶联 EP1、EP2 受体活化 PKA 和 PKC 信号通路使芳香化酶的合成增加,从而增加雌激素的表达量^[12],这正可以解释 COX 或选择性 COX-2 抑制剂降低芳香化酶水平的机制^[13]。当前主要认为 AIs 获得性耐药与 ER 和生长因子信号通路的串扰通路介导肿瘤细胞的存活和增殖有关, Ghayad et al^[14] 发现 AIs 耐药后 EGFR/HER2 通路活化,下游的 PI3K/AKT 信号通路生长因子 AKT 活

性增加。Chuang et al^[15] 研究发现在乳腺癌的转移过程与 ATK 的活化介导 COX-2 的表达的上调密切相关,推测 COX-2 与 AKT 通路转导系统可能存在交互点。本研究显示 P-AKT 蛋白的表达与 COX-2 蛋白呈正相关性。Bcl-2 蛋白产物在大部分的乳腺癌组织中存在高表达,且有一部分伴随雌或孕激素受体的阳性表达,Bcl-2 属于 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白,与凋亡逃避和抗药性密切相关,Bcl-2 在抵御外界凋亡诱导刺激中起直接作用,同时 Bcl-2 高表达的肿瘤细胞通过抑制细胞凋亡不断增殖与侵袭。有研究^[16] 显示,在乳腺癌细胞中抑制 AKT 的活化后可抑制 Bcl-2 的表达,从而抑制抗凋亡作用,促进凋亡。本研究显示使用 MTX 作用于 MCF-7/EXE 细胞后,Bcl-2 出现下调,这可能是 MTX 抑制 COX-2 后,下调 P-AKT 的表达,从而级联抑制了 Bcl-2 水平,提示低剂量 MTX 能够抑制 COX-2 的表达及可能存在 COX-2 与 PI3K/AKT 通路的相互作用而发挥促凋亡作用,当 EXE 联合 MTX 后,COX-2、P-AKT、Bcl-2 下调更明显,提示低剂量 MTX 能够作为潜在的 COX-2 抑制剂通过与 AIs 耐药通路的交互作用,发挥逆转耐药作用。通过流式周期分析显示,两药联合组 S 期阻滞较 MTX 单药显著,提示低剂量的 MTX 与 AIs 联合使用,可能成为逆转 AIs 耐药的新方法,这种高效低毒逆转方式值得进一步的研究。

参考文献

- [1] Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, et al. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(5):596-604.
- [2] Kamangar F, Dores G M, Anderson W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol* 2006 24(14):2137-50.
- [3] Steele N, Zekri J, Coleman R, et al. Exemestane in metastatic breast cancer: effective therapy after third-generation non-steroidal aromatase inhibitor failure [J]. *Breast* 2006, 15(3):430-6.
- [4] Sui H, Zhu H R, Wu J, et al. Effects of Jianpi Jiedu Recipe (JJR) on reversion of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance through COX-2 pathway in colorectal cancer [J]. *Chin J Integr Med* 2013: [Epub ahead of print].
- [5] Lipton A, Campbell-Baird C, Witters L, et al. Phase II trial of gemcitabine, irinotecan, and celecoxib in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *J Clin Gastroenterol* 2010 44(4):286-8.
- [6] Mello S B, Barros D M, Silva A S, et al. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, 39(5):

- 533 - 6.
- [7] 胡丽霞,袁媛,潘跃银等.乳腺癌依西美坦耐药细胞株的建立及耐药机制的初步研究[J].安徽医科大学学报,2012,47(12):1404-7.
- [8] Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines[J]. *Inflamm Res* 2005 54(7):273-80.
- [9] Mihara M, Urakawa K, Takagi N, et al. *In vitro* and *in vivo* biological activities of a novel nonpolyglutamable anti-folate, MX-68[J]. *Immunopharmacology* 1996 35(1):41-6.
- [10] Mariani F, Sena P, Marzona L, et al. Cyclooxygenase-2 and hypoxia-inducible factor-1 α protein expression is related to inflammation and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis[J]. *Cancer Lett* 2009 279(2):221-9.
- [11] Brodie A M, Lu Q, Long B J, et al. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 79(1-5):41-7.
- [12] Richards J A, Brueggemeier R W. Prostaglandin E2 regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(6):2810-6.
- [13] Lykkesfeldt A E, Henriksen K L, Rasmussen B B, et al. In situ aromatase expression in primary tumor is associated with estrogen receptor expression but is not predictive of response to endocrine therapy in advanced breast cancer [J]. *BMC Cancer* 2009, 9:185.
- [14] Ghayad S E, Vendrell J A, Ben Larbi S, et al. Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Int J Cancer* 2010, 126(2):545-62.
- [15] Chuang C W, Pan M R, Hou M F, et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 expression via AKT-mediated phosphorylation and activation of Sp1 in breast cancer cells [J]. *J Cell Physiol* 2013, 228(2):341-8.
- [16] Bratton M R, Duong B N, Elliott S, et al. Regulation of ER α -mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk: implications for breast cancer cell survival [J]. *Int J Oncol* 2010 37(3):541-50.

Synergistic effect of exemestane and low-dose methotrexate on exemestane-resistant MCF-7 human breast cancer cells and reversal mechanism of drug-resistance

Ju Lingli¹, Yuan Yuan², Pan Yueyin¹

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²The Central Laboratory of Binhu Hospital, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the combined effect of exemestane and low-dose methotrexate on exemestane-resistant MCF-7 human breast cancer cells (MCF-7/EXE). **Methods** Antiproliferative effects of exemestane and low-dose of methotrexate, alone and in combination on growth of MCF-7/EXE cells were assessed by using the MTT assay. Synergistic interaction between the two drugs was evaluated in vitro by using the combination index (CI) method. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry in a half inhibitory concentration of exemestane and low-dose of methotrexate. The changes of apoptosis on MCF-7/EXE cells exposed to two drugs alone or in combination were observed by fluorescence microscope. The expression of Bcl-2, AKT, P-AKT and cyclooxygenase-2 was investigated by Western blot. **Results** MTT assays indicated that the combination treatment apparently decreased the viability of MCF-7/EXE cells compared to single drug treatment (CI < 0.9). In addition, the combination of exemestane and low-dose methotrexate exhibited a synergistic inhibition of cell proliferation, arrested the cell cycle in the S phase significantly and produced a stronger inhibitory effects on P-AKT, Bcl-2 and cyclooxygenase-2 expression than control or individual drug treatment. **Conclusion** The combination of the two inhibitors significantly increases the response as compared to single agent treatment, suggesting that combination treatment which can reverse the resistance of exemestane could be a more effective approach to breast cancer.

Key words exemestane; methotrexate; drug-resistance cell; breast cancer