

文章编号 1006-8147(2019)06-0559-05

论 著

FKBP51 表达降低促进雌激素受体阳性乳腺癌他莫昔芬耐药机制初探

柴慈曼^{1,2}, 尚志群², 牛远杰²

(1.天津医科大学第二医院甲状腺乳腺外科, 天津 300211; 2.天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要 目的:初步探讨 FKBP51 在雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌他莫昔芬耐药中的作用及分子机制。方法:采用 ER+人乳腺癌 MCF-7 细胞建立对他莫昔芬耐药的 MCF-7/TAMR 细胞,MTT 法检测他莫昔芬对 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞增殖的影响。Western blot 检测 FKBP51 和蛋白激酶 B(AKT)信号通路中相关蛋白在 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞中的表达情况。通过敲低或者过表达 FKBP51,观察 FKBP51 对 ER+乳腺癌细胞耐药性及 AKT 信号通路的影响。在 ER+人乳腺癌组织标本中验证 FKBP51 表达情况。结果:成功建立 MCF-7/TAMR 细胞株。他莫昔芬对 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞增殖的抑制率均呈剂量依赖性,且对 MCF-7 细胞增殖的抑制率高于 MCF-7/TAMR 细胞($P<0.05$)。Western blot 结果显示,FKBP51 在 MCF-7/TAMR 细胞中的表达低于 MCF-7 细胞,并且其表达水平的降低激活 AKT 信号通路的活性,促进乳腺癌细胞对他莫昔芬的耐药。同时,FKBP51 在 ER+他莫昔芬耐药人乳腺癌组织中表达水平低于他莫昔芬敏感人乳腺癌组织。结论:FKBP51 表达水平降低促进 ER+乳腺癌患者对他莫昔芬耐药,可能与激活细胞内 AKT 信号通路有关。

关键词 FKBP51;雌激素受体;乳腺癌;他莫昔芬;AKT 信号通路

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Effect of FKBP51 on tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer

CHAI Ci-man^{1,2}, SHANG Zhi-qun², NIU Yuan-jie²

(1.Department of Breast and Thyroid Surgery, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect of FKBP51 on tamoxifen resistance in estrogen receptor positive (ER+) breast cancer and its mechanism. **Methods:** The ER+ human breast cancer MCF-7 cells was used to establish tamoxifen-resistant MCF-7/TAMR cell line. The effect of tamoxifen on the proliferation of MCF-7 and MCF-7/TAMR cells was detected by MTT method. Western blot was used to detect the expressions of FKBP51 and the associated proteins in AKT signaling in MCF-7 and MCF-7/TAMR cells. **Results:** The MCF-7/TAMR cell line was successfully established. The inhibitory rates of tamoxifen on the proliferation of two breast cancer cells were in a dose-dependent manner, which on MCF-7 cells was significantly higher than that on MCF-7/TAMR cells ($P<0.05$). Western blot results showed that the expression of FKBP51 in MCF-7/TAMR cells was significantly lower than that in MCF-7 cells. Compared with MCF-7 cells, AKT signaling increased in MCF-7/TAMR cells. **Conclusion:** lower FKBP51 expression promotes tamoxifen resistance in patients with ER+ breast cancer, which may be related to activation of AKT signaling pathway.

Key words FKBP51; estrogen receptor; breast cancer; tamoxifen; AKT signaling pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,多发病于绝经期前后的妇女,其发病率约占女性恶性肿瘤的7.0%~10.0%^[1],严重威胁着女性的生命健康。在乳腺癌的发生发展过程中,雌激素及其受体信号通路发挥了重要作用,相关数据显示70%左右乳腺癌患者呈雌激素受体阳性(ER+)^[2]。目前,内分泌治疗是ER+乳腺癌的主要治疗方法之一,其可显著延缓乳腺癌的进展,减少乳腺癌的复发率,提高患者生存率^[3]。临床常采用的内分泌治疗药物主要有他莫昔

芬、托瑞米芬、氟维司群、阿那曲唑等。既往他莫昔芬被公认为是内分泌治疗绝经前乳腺癌的经典药物,但仍有30%的ER+乳腺癌患者发生原发性耐药,40%的患者发生获得性耐药,相关数据显示该类患者仅有2~3年的中位生存时间,存活大于20年的患者极少^[4]。因此,如何降低ER+乳腺癌患者他莫昔芬耐药,提高内分泌药物的疗效,对目前ER+乳腺癌的治疗具有十分重要意义。近年来,有研究报道AKT通路蛋白异常磷酸化对ER+乳腺癌他莫昔芬耐药具有促进作用^[5]。而关于乳腺癌他莫昔芬耐药机制的研究,尤其是FKBP51通过蛋白激酶B(AKT)信号通路促进ER+乳腺癌他莫昔芬耐药的机制研

基金项目 天津医科大学第二医院青年基金项目(2017ydey05)

作者简介 柴慈曼(1985-),女,医师,博士在读,研究方向:肿瘤内分泌耐药机制;通信作者:牛远杰,E-mail:m15122901226@163.com。

究仍比较欠缺,本实验就该机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 MCF-7, 高糖型 DMEM 培养液(购自 Gibco 公司),胎牛血清(购自 Gibco 公司),他莫昔芬(购自 Sigma 公司),人 FKBP51 抗体(购自北京合生基因科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 DMEM 培养基中注入 10%胎牛血清培养 MCF-7 细胞,将其置于温度为 37℃,含 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱进行常规培养,实验时间在细胞对数生长期。

1.2.2 他莫昔芬耐药细胞株(MCF-7tamoxifen resistant cell line, MCF-7/TAMR)的建立 采用高浓度短时间他莫昔芬冲击法诱导 MCF-7 野生型细胞株建立 MCF-7/TAMR 细胞株。取大约 1×10^6 个对数生长期的 MCF-7 细胞并接种于培养皿,待细胞贴壁后加入含他莫昔芬的培养液(终浓度为 1×10^{-6} mol/L),48 h 换液 1 次,换液完成后加入含他莫昔芬完全培养液(浓度为 1×10^{-6} mol/L),培养 21 d 后进行无药物干预下扩增细胞 7 d。细胞长期培养于含他莫昔芬的完全培养液(终浓度为 1×10^{-7} mol/L)使 MCF-7/TAMR 细胞株维持耐药性。

1.2.3 MTT 法检测他莫昔芬耐药乳腺癌细胞的抑制率及耐药指数 以 6×10^3 /孔将 MCF-7、MCF-7/TAMR 细胞接种于 96 孔板中,MCF-7 为对照组,MCF-7/TAMR 为实验组。1d 后细胞贴壁,开始进入对数生长期,梯度给药。3d 后以 10 μ L/孔将 MTT 溶液加入 96 孔板中并置于 37℃培养箱中孵育 4h,酶标仪 490nm 检测吸光度。用吸光度值计算细胞抑制率,求出半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复 3 次。细胞抑制率=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%,耐药指数(RI)=耐药细胞 IC₅₀/诱导前细胞 IC₅₀。

1.2.4 Western Blot 检测 FKBP51 及 AKT 信号通路相关蛋白表达 提取各组细胞蛋白,采用 30 μ g/泳道给予蛋白上样,以恒定电压为 80V 进行 20 min 聚合胶电泳和恒定电压为 120V 进行 60 min 分离胶电泳,然后采用恒定电流为 250 mA 进行 90 min 转膜,以浓度为 5%的脱脂牛奶溶液进行 1 h 封闭,一抗孵育过夜;第 2 天采用 TBST 溶液进行漂洗条带,洗净一抗,二抗常温孵育 1h,洗净二抗,用 ECL 发光剂进行条带处理并用化学发光成像仪进行分析。

1.2.5 PCR 检测乳腺癌人组织中 FKBP51 的 mRNA 表达水平 按照总 RNA 提取步骤提取人乳腺癌组织中的总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 浓度

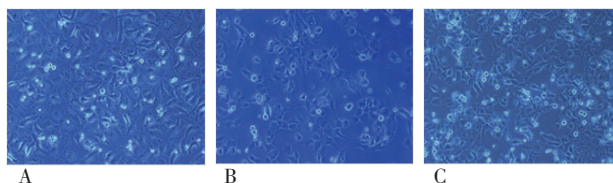
及纯度。PCR 反应体系为 cDNA 1 μ L,前引物(10 μ mol) 1 μ L,后引物(10 μ mol) 1 μ L,2×Taq Plantinum PCR MasterMix 10 μ L,ddH₂O 7 μ L,cDNA 的量不大于 1 μ g,加样后混匀,短暂离心;上机进行 PCR,设置循环参数,①95℃ 10min,②95℃ 30s,③55℃ 30s,④72℃ 1min,⑤72℃ 5min,②至④设置 30 个循环;然后取 8 μ LPCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,120V 电泳半小时后于紫外灯下观察实验结果并拍照。引物信息:FKBP51-前引物-5'-ATGAAGAAAGCCCCACAGC-3';FKBP51-后引物-5'-CCTCACCATTCCCACTCT-3';GAPDH-前引物-5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3';GAPDH-后引物-5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2.6 基因敲除/过表达慢病毒载体构建验证 FKBP51 在他莫昔芬耐药中的作用 将构建好的 FKBP51 敲除质粒/过表达质粒与慢病毒包装质粒 psPAX2、慢病毒包装质粒 pMD2G 按 4:3:2 比例混合均匀后,使用罗氏转染试剂将混合质粒转入 293T 细胞,在 293T 细胞中各种组分的质粒进行融合从而产生并分泌可以敲除/过表达 FKBP51 片段的慢病毒。小心收集含有慢病毒的 293T 细胞培养基,高速离心并滤器过滤后培养待敲除/过表达的 MCF7 细胞,即可得到实验所需的敲除/过表达 FKBP51 细胞,MTT 验证细胞增殖活性变化,western Blot 检测 AKT 信号通路相关蛋白表达变化。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 ER⁺人乳腺癌 MCF-7/TAMR 通过 21d 他莫昔芬(浓度为 1×10^{-6} mol/L)处理及 7d 无药扩增后,MCF-7/TAMR 细胞株成功建立,细胞形态见图 1。



A.野生型 MCF-7 细胞株 B.他莫昔芬 1×10^{-6} mol/L 培养 10d 后的 MCF-7 细胞 C. MCF-7/TAMR 细胞株

图 1 不同处理 MCF-7 细胞株的镜下生长(倒置显微镜×400)

Fig1 The growth of MCF-7 cell line under different treatment (400×)

2.2 他莫昔芬对 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 的抑制率及耐药指数 给予 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞不同浓度的他莫昔芬处理 24 h 后,他莫昔芬对乳腺癌细胞生长的抑制率随着其浓度增加而上升,但等浓

度下他莫昔芬对 MCF-7 的抑制率显著高于 MCF-7/TAMR,差异具有统计学意义($P<0.05$),如图 2。MCF-7/TAMR 组的半数抑制浓度(IC_{50})为 $(31.41\pm 1.57)\mu\text{g/mL}$,高于 MCF-7 组的 IC_{50} 值 $(8.65\pm 0.58)\mu\text{g/mL}$ 。其中 MCF-7/TAMR 的耐药指数为 (3.58 ± 0.33) 。

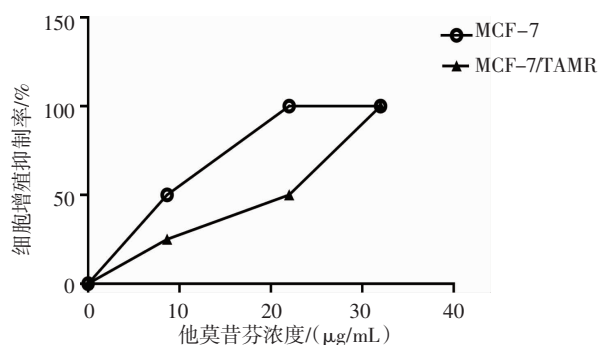


图2 24h 后不同浓度他莫昔芬对两组细胞生长抑制率的比较

Fig2 the comparison of cell growth inhibition rates in two groups with different concentration of tamoxifen after 24 hours

2.3 FKBP51 表达水平及 AKT 信号通路活性在 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞中差异 我们通过 Western blot 实验,在 MCF-7 及 MCF-7/TAMR 细胞中检测了 FKBP51 蛋白和 AKT 信号通路中的关键分子磷酸化 AKT(p-AKT)及下游分子表达的变化。发现 FKBP51 在 MCF-7/TAMR 细胞中表达水平相比于 MCF-7 中表达水平降低,见图 3。同时,观察到总的 AKT 水平没有明显变化,但是 AKT 的磷酸化水平在耐药细胞中有明显的升高,AKT 下游效应分子 p-Erk1/2 和 p-4E-BP1 也随着 AKT 磷酸化水平的增加而表达升高(图 3)。

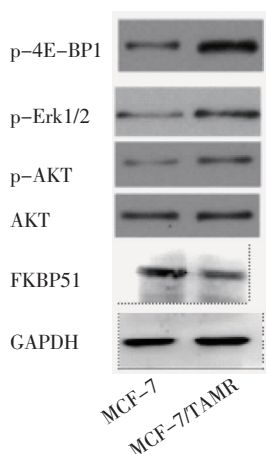


图3 两组细胞系中 FKBP51 表达及 AKT 信号通路活性变化的 Western blot 结果

Fig3 The expression of FKBP51 in two groups of cell line and the changes of AKT signaling pathway activity detected by Western blot

2.4 在乳腺癌人组织中验证 FKBP51 表达差异 收集了他莫昔芬敏感乳腺癌病人及他莫昔芬耐药病

人的新鲜癌组织,提取组织的 RNA,通过 poly-A 为引物的 RNA 反转录,得到 cDNA,通过 PCR 技术,发现 FKBP51 在他莫昔芬耐药的癌组织比他莫昔芬敏感的组织中表达水平降低(见图 4),与细胞系的结果相一致。

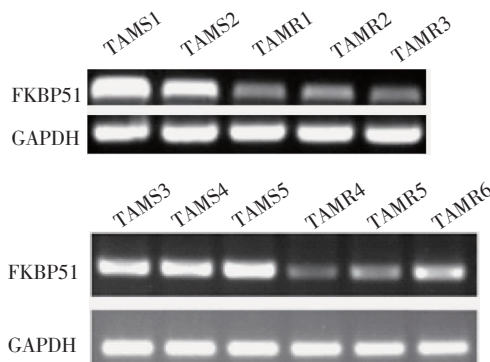


图4 他莫昔芬敏感及他莫昔芬耐药乳腺癌病人的新鲜癌组织中 FKBP51 表达水平 PCR 结果

Fig4 The expression of FKBP51 detected by PCR in breast cancer tissue from the patients sensitive to or resistance to tamoxifen

2.5 FKBP51 敲低/过表达对细胞增殖的影响 为了验证 FKBP51 蛋白在乳腺癌他莫昔芬耐药过程中的作用,我们在 MCF-7 细胞中敲低 FKBP51,在 MCF-7/TAMR 细胞中过表达 FKBP51,通过 MTT 实验检测细胞在 $5\mu\text{g/mL}$ 的他莫昔芬培养基中的生长情况。发现 MCF-7 中 FKBP51 敲低后能够增强 MCF-7 对他莫昔芬的耐药,在 MCF-7/TAMR 细胞中过表达 FKBP51 能够增强细胞对他莫昔芬的敏感性(见图 5)。

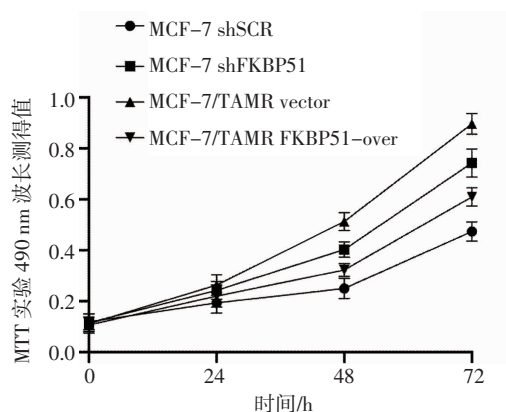


图5 FKBP51 敲除/过表达对细胞增殖的影响

Fig5 The effect of Knocking down or overexpressing FKBP51 on cell proliferation

2.6 FKBP51 敲低/过表达对 AKT 信号通路的影响 为了验证 FKBP51 蛋白在乳腺癌他莫昔芬耐药过程中对 AKT 信号通路的影响,我们在 MCF-7 细胞中敲低 FKBP51,在 MCF-7/TAMR 细胞中过表达

FKBP51,通过 Western blot 实验观察 AKT 信号通路的变化。发现 FKBP51 的敲低能够增强 p-AKT 的水平,下游效应分子 p-Erk1/2 和 p-4E-BP1 也随着 AKT 磷酸化水平的增加而表达升高;过表达则相反。见图 6。

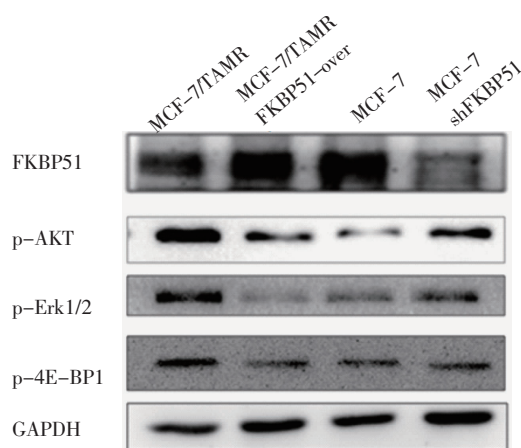


图 6 FKBP51 敲除/过表达对 AKT 通路的影响

Fig6 Regulation of AKT signaling pathway by knocking down or over expressing FKBP51

3 讨论

据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制中心最新公布的乳腺癌发病数据显示,全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第 1 位,乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题^[6]。随着医疗救治技术的不断发展,结合化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗等治疗手段的综合治疗方式已逐渐在临床普及^[7]。乳腺癌按照基因的临床分型有多种亚类,其中多数为 ER+患者。目前针对乳腺癌的激素依赖性,采取内分泌治疗的手段,通过服用雌激素类似物达到拮抗雌激素受体从而阻断受体通路的目的。他莫昔芬是雌激素类似物代表性药物之一^[8]。随着他莫昔芬临床应用,目前关于 ER+患者对他莫昔芬耐药的相关报道也逐渐增多。

乳腺作为激素依赖性器官,女性体内分泌的孕激素、雌激素等可通过相应 ER 及 PR 受体相结合的过程促进乳腺增生、增殖^[9]。对于 ER+的乳腺癌患者,机体对乳腺癌内分泌治疗方案较为敏感,通常预后较好,但内分泌耐药的出现使得疗效受到严重影响,所以对于内分泌耐药机制的研究逐渐成为热点问题。

FKBP51 是肽基脯氨酰基异构酶主酶家族成员之一,人类基因组测序显示其基因位于人类染色体 6q21.3~21.2,其基因总长度为 156kb,该蛋白含有 457 个氨基酸,其蛋白质 N 末端基序具有肽基脯氨酰基异构酶活性^[9]。

目前研究显示,FKBP51 可通过与类固醇激素受体相互作用产生生物学效应^[10],韩樱松等^[11]指出,雌激素、孕激素可迅速上调 FKBP51 在相关组织中的表达水平。目前认为,FKBP51 能够作为孕激素的靶基因,同时参与孕激素抑制乳腺癌细胞生长及促乳腺癌细胞分化的作用^[12-13]。笔者怀疑 ER+乳腺癌患者 FKBP51 表达水平的降低可能参与了他莫昔芬耐药。本研究利用高浓度短时间他莫昔芬冲击法诱导 MCF-7 野生型细胞株建立 MCF-7/TAMR 细胞株,同时检测非耐药乳腺癌细胞及耐药乳腺癌细胞中 FKBP51 的表达情况,而后通过 Western blot 检测 AKT 信号通路相关蛋白表达情况。结果显示,通过浓度为 10^{-6} mol/L 的他莫昔芬连续培养 3 周再通过 1 周的扩增后,成功培养出 MCF-7/TAMR 耐药株。给予 MCF-7 和 MCF-7/TAMR 细胞不同梯度浓度的他莫昔芬 24h 后,他莫昔芬对乳腺癌细胞增殖的抑制率随着其浓度增加而上升,但等浓度下他莫昔芬对 MCF-7 的抑制率显著高于 MCF-7/TAMR, MCF-7/TAMR 耐药性显著高于 MCF-7 细胞。FKBP51 在 MCF-7/TAMR 细胞中的相对表达量显著低于在 MCF-7 细胞中的相对表达量。说明在他莫昔芬耐药株中,FKBP51 表达显著降低,同时与 MCF-7 细胞相比较,在 MCF-7/TAMR 细胞株中 p-AKT 及其下游蛋白表达均明显增加,结果说明当 MCF-7 细胞产生他莫昔芬耐药后,其细胞内 AKT 通路被激活,相关蛋白表达明显升高。FKBP51 敲低及过表达实验结果也证明了 FKBP51 表达水平的降低,激活了 AKT 信号通路,促进乳腺癌细胞他莫昔芬耐药。有相关研究显示,FKBP51 能够通过 NF- κ B 通路参与细胞凋亡及增殖调控,同时可增加细胞内微观系统稳定性,上调 FKBP51 表达可明显抑制胰腺癌细胞增殖,提升化疗敏感性。但尚缺乏 FKBP51 乳腺癌内分泌耐药机制中与 AKT 通路的作用研究。本研究表明 MCF-7/TAMR 细胞株 AKT 通路的激活可能与 FKBP51 表达的降低有关,促进 ER+患者对他莫昔芬的耐药。

综上所述,FKBP51 表达水平的降低促进 ER+患者对他莫昔芬耐药,其主要机制可能与激活细胞内 AKT 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 李贺,郑荣寿,张思维,等. 2014 年中国女性乳腺癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志,2018,40(3):169
- [2] 王建兰,袁彦玲,郑水,等. 云南省白族育龄女性雌激素受体 α 基因多态性的分布频率[J]. 中国妇幼保健,2017,32(6):1175

(下转第 576 页)

.....

(上接第 562 页)

- [3] 董吉,丁炎,吴鹏西,等. 乳腺癌超声及超声造影表现与生物学预后因子的相关性[J]. 江苏医药, 2016, 42(17):1872
- [4] 颜宁,陈迪,冯得财,等. 雌激素受体与乳腺癌内分泌治疗耐药的相关性研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 9(11):1304
- [5] 谭文彬,陆靖,杜峰,等. 雌激素受体在 MCF-7 乳腺癌细胞对他莫昔芬耐药中的作用[J]. 中国热带医学, 2017, 17(1):47
- [6] 郑荣寿. 卫生部疾病预防控制局 2012 年全国肿瘤登记工作推进会暨技能培训会议简报[J]. 中国肿瘤, 2012, 15(10):752
- [7] 田波. 乳腺癌改良根治术中保留肋间臂神经的临床意义[J]. 江苏医药, 2016, 42(20):2283
- [8] 林阳,章斌,李继会,等. 耐他莫昔芬人乳腺癌细胞株的建立及其 18F-FDG 摄取的降低机制[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 6(12):783
- [9] 陈妍,王婧,徐旖旎,等. 他莫昔芬对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭能力、MMP-9 活性和表达的影响及机制[J]. 山东医药, 2016, 56(26):6
- [10] 李庆敏,宋淑亚,董竞,等. FKBP51 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(16):2419
- [11] 韩樱松,孙桂彬,冯瑾,等. FK506 结合蛋白 51(FKBP51)的研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 9(11):1304
- [12] Chen J M, Bai J Y, Yang K X. Effect of resveratrol on doxorubicin resistance in breast neoplasm cells by modulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. IUBMB Life, 2018, 70(6):491
- [13] 赵雅琛,孙旻,黄素辉,等. IL-6 经 PI3K/AKT 通路诱导卵巢癌细胞对他莫昔芬耐药[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6):601
- (2019-01-29 收稿)