

Caveolin-1对乳腺癌细胞系MCF-7增殖和存活的影响

陆瑞盛¹ 马 骥¹ 张 燕^{1,2} 于玲莉^{1,2} Ambre Spencer²
David Cluet² Brian B. Rudkin^{1,2*} 袁崇刚^{1*}

(¹华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; ²Differentiation & Cell Cycle Group, Cellular Molecular Biology Laboratory, UMR 5239 CNRS/ENS Lyon/University of Lyon 1, IFR 128, Bioscience Lyon-Gerland. 46, Allée d'Italie 69364 Lyon Cedex 07)

摘要 该文研究窖蛋白(Caveolin-1)对乳腺癌细胞系MCF-7细胞增殖与存活的影响。运用蛋白质印迹方法(Western blot)检测发现, Caveolin-1在5株不同细胞系均只有低表达。运用电穿孔转染方法在乳腺癌细胞系中高表达Caveolin-1, 运用Western blot检测转染后Caveolin-1表达情况发现, 转染后细胞内Caveolin-1表达上升, 并具有生物活性。运用单核细胞直接细胞毒性测定法(MTT)检测发现, 转染后乳腺癌细胞系MCF-7增殖速度降低。运用Western blot方法和免疫荧光(immunofluorescence)方法检测转染后细胞凋亡途径的变化, 磷酸化的P38蛋白含量上升, Bax表达量明显上升。据此推测Caveolin-1抑制MCF-7细胞的增殖和存活, 并诱导基于Bax途径的细胞凋亡。

关键词 Caveolin-1; 乳腺癌; 增殖和存活

细胞膜窖(Caveolae)于上世纪50年代被发现, 是一种囊泡样的细胞膜亚结构, 由位于胞质侧的Caveolin蛋白与膜上的脂筏组成。Caveolin基因家族有三个成员, 即Caveolin-1, Caveolin-2和Caveolin-3。这些都是膜整合蛋白, 在维持Caveolae的功能中起到重要作用^[1-2]。Caveolin-1是这个基因家族中最早发现, 也是研究最深入的成员。它通过N段序列(61~101)的相互作用形成14~16个单体组成的同聚物, 并通过N端的脚手架域(Caveolin scaffolding domain, CSD)与众多信号转导蛋白内保守的Caveolin结合域(Caveolin binding domain, CBD)产生相互作用^[3-4], 使结合后的信号子处于失活状态, 从而实现其对信号通路的负性调控。

Bcl-2基因家族的成员是高等动物细胞生存和死亡信号的重要整合因子^[5-6]。目前, 已经发现的Bcl-2基因家族按功能可大致分为两类, 一类具有抑制凋亡作用, 如哺乳动物的Bcl-X1、Bcl-W、Mcl-1、A1、线虫Ced-9等, 而另一类具有促进凋亡作用, 如Bax、Bcl-Xs、Bad、Bak、Bik/Nbk、Bid等。Bax的结构与细菌毒素高度类似; 而体外实验证实, Bax能在脂质体上形成离子通道(巨孔), 并将脂质体中的细胞色素C释放出来。Akt是Bax/Bcl-2的上游调节因子, Akt的活化能抑制Bax的凋亡信号。Akt的活化是通过PI3K

信号通路实现的^[7], 而Caveolin-1则被证明与PI3K具有相互作用, Caveolin-1的过表达也能通过PI3K机制使成纤维细胞对神经酰胺诱导的死亡敏感化^[8]。

近期的研究发现, 多种癌细胞尤其是乳腺癌细胞都出现Caveolin-1的低表达或突变, 并且使用RNAi的方法下调Caveolin-1的表达能引起雌激素水平的下降^[9]。因此, Caveolin-1对癌细胞的增殖和存活的抑制作用及其相关细胞信号途径的研究引起了广泛关注。本实验中, 我们运用电转染方法在乳腺癌细胞系MCF-7中表达Caveolin-1, 检测转染前后MCF-7细胞的增殖、存活和相关的Akt-Bax凋亡途径, 了解Caveolin-1可能的作用途径和相关信号通路, 由此了解和研究Caveolin-1影响乳腺癌细胞系MCF-7增殖和存活的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

转染试剂盒为Lonza产品, MTT试剂为Invitrogen

收稿日期: 2011-03-01 接受日期: 2011-06-10

上海市国际合作(No.075407059)资助项目

*通讯作者。Tel: 334-72-72-81-96, E-mail: bbrudkin@ens-lyon.fr;

Tel: 021-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn

公司产品, Caveolin-1抗体、Bax抗体和Bcl-2抗体为Santa cruz产品, β -tubulin抗体为Millipore产品, p-P38抗体、Alexa488、Alexa594荧光二抗为Invitrogen产品, p-Caveolin-1抗体为Bioworld产品, 蛋白浓度测定试剂盒为Bio-Rad产品, 红外荧光二抗为Odyssey产品, DAPI核染料为Sigma-Aldrich产品, 人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-453、ZR-75-30、B-CAP-37、MCF-7购于中国科学院细胞库, L-15培养基、DMEM培养基、新生牛血清(new born cattle serum, NBCS)均为Gibco产品。

1.2 方法

1.2.1 乳腺癌细胞系的培养 MCF-7、MB-MDA-435、MB-MDA-453、B-CAP-37细胞培养在含有10% NBCS的DMEM-HG培养液中, MB-MDA-231细胞培养在含有10% NBCS的L-15培养液中, ZR-75-30细胞培养在含有10% NBCS的1640培养液中。MB-MDA-231细胞置37 °C培养箱密闭培养, 其他细胞置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 Western Blot蛋白检测 细胞裂解抽提蛋白, 通过SDS/PAGE电泳(80 μ g protein/well), 100 V电压电转1 h, Odyssey封闭液封闭1 h, 加入一抗后于4 °C振荡孵育过夜。0.5% TBST洗膜3 \times 5 min。加入Odyssey二抗, 抗兔(1:5 000), 抗鼠(1:15 000), 室温孵育1 h, 0.5% TBST洗膜3 \times 5 min。Odyssey仪器检测条带。用Odyssey公司相应软件对印迹结果进行半定量测定。

1.2.3 MCF-7细胞的转染 在37 °C、5% CO₂条件下培养MCF-7细胞, 待细胞长至70%以上融合度后, 用胰酶消化, 离心, 制成细胞悬液后计数, 用培养基调整细胞密度为1 \times 10⁶/管。根据Amaxa的说明书转染, 选择P-020程序转染MCF-7细胞, 以只加电转液的MCF-7细胞作为空白对照组。在转染好的电转杯中加事先温好的培养基, 转移至6孔板中, 每孔2 mL完全培养基。通过共转报告基因GFP, 转染24 h后, 用荧光显微镜观察细胞内绿色荧光的多寡评估转染效率。

1.2.4 细胞增殖分析 将MCF-7细胞以1.5 \times 10³/孔的密度接种于96孔板中正常培养, 检测时每孔加入20 μ L的MTT溶液(5 mg/mL), 在培养箱中孵育6 h后, 吸去培养液, 每孔加入150 μ L DMSO, 用多功能酶标仪检测590 nm下的吸光度值。

1.2.5 免疫荧光检测 将贴有细胞的盖玻片, 以

4%多聚甲醛固定30 min, PBS漂洗3 \times 5 min。加封闭剂于37 °C湿盒中孵育1 h, 吸去封闭剂, 加入一抗后于4 °C湿盒孵育过夜。PBS漂洗3 \times 5 min, 加入荧光二抗, 孵育1 h, PBS漂洗3 \times 5 min, 再加入核染料DAPI孵育15 min, PBS漂洗3 \times 5 min。加入抗荧光猝灭剂后, 于荧光显微镜下进行观察。

1.2.6 统计学处理 采用Microsoft excel软件分析。计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。单变量配对资料之间的比较采用配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 Caveolin-1在乳腺癌细胞系中的表达

Western blot结果显示, Caveolin-1在MB-MDA-231细胞系中高表达, 而在参与检测的其它5种乳腺癌细胞系, 即ZR-75-30、MB-MDA-435、MB-MDA-453、MCF-7以及B-CAP-37中均只有极少量表达(图1)。

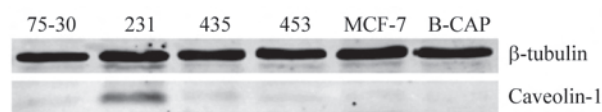


图1 Caveolin-1在6种乳腺癌细胞系中的表达

Fig.1 Expression of Caveolin-1 in 6 breast cancer cell lines

2.2 瞬时转染Caveolin-1的MCF-7细胞的构建

转染24 h后在显微镜下随机选取多个视野, 通过比较明场下细胞数与发绿色荧光的细胞数, 得出转染效率约为40%左右(数据未列入)。在参与检测的6种乳腺癌细胞系中, MCF-7细胞的Caveolin-1表达量最低, 而细胞生长迅速, 因此, 我们选择该细胞系作为后续研究的对象。Western blot结果显示, 转染后MCF-7细胞中有大量Caveolin-1蛋白表达(图2)。

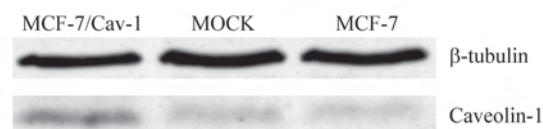
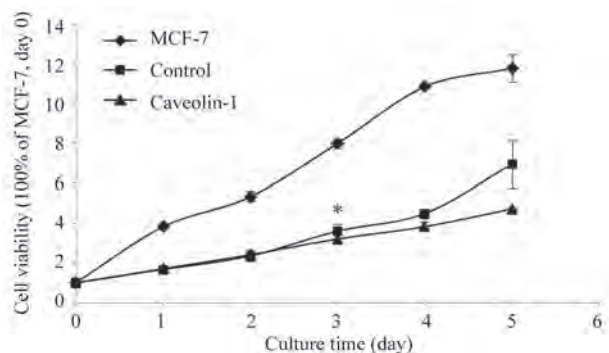


图2 瞬时转染Caveolin-1的MCF-7细胞的Western blot结果

Fig.2 Caveolin-1 expression in transiently transfected MCF-7 cells

2.3 转染Caveolin-1后MCF-7细胞增殖率的变化

MTT结果显示,与未转染Caveolin-1的MCF-7细胞和进行了空转的MCF-7细胞相比,转染Caveolin-1的MCF-7细胞增殖缓慢(图3)。



转染的MCF-7细胞与空转相比, *P<0.05。

Caveolin-1/MCF-7 cells compared with control, *P<0.05.

图3 MTT法检测转染Caveolin-1后MCF-7细胞增殖率的变化

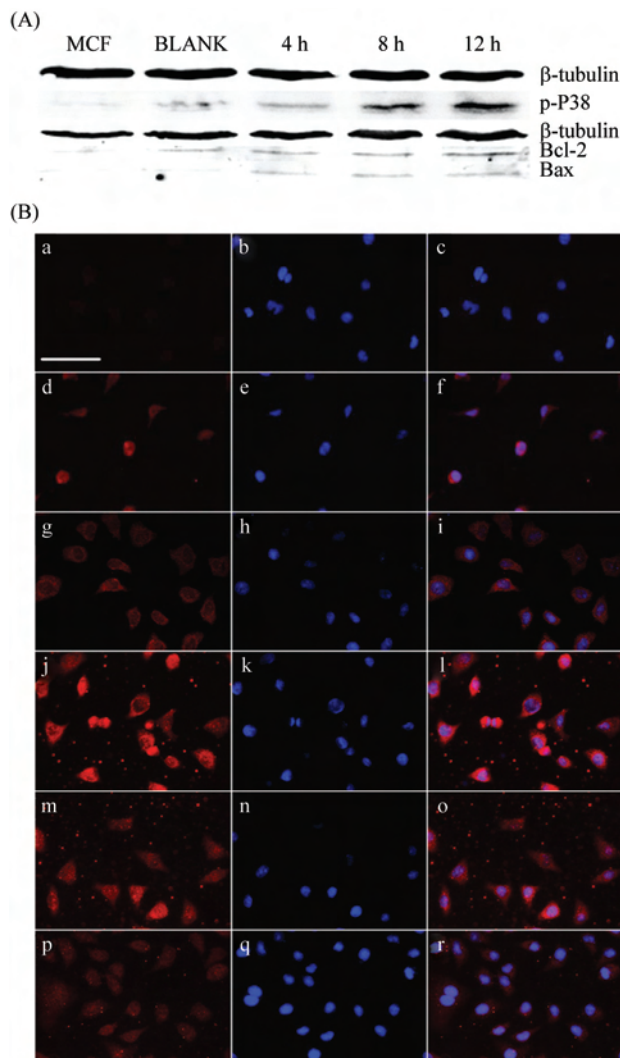
Fig.3 Proliferation rates of MCF-7 cells transfected with Caveolin-1

2.4 转染Caveolin-1对MCF-7细胞凋亡通路的影响

Western blot半定量结果显示,转染后随着时间推移,细胞内磷酸化的P38蛋白含量不断上升,Bax表达也不断上升,而Bcl-2的表达没有明显变化(图4A)。免疫荧光结果显示,转染的Caveolin-1能作为底物被激酶磷酸化,转染Caveolin-1后的MCF-7细胞中Bax表达明显上升,而Bcl-2表达略有降低(图4B)。

3 讨论

细胞膜窖(Caveolae)是一类富含胆固醇糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白以及鞘糖脂等物质的细胞膜亚结构^[10],最近的研究发现,Caveolae的功能不仅仅是参与跨膜物质的转运,也是细胞信号转导中蛋白分子富集的枢纽^[10-11]。C端的44个氨基酸残基使这些同聚体能相互连接^[12-3,10,12-13]。Caveolin-1的N端序列中有一段被称为脚手架区(CSD)的序列,能与大多数信号蛋白分子中存在的CBD结合,并对信号转导产生影响。Hulit等^[14]的研究发现,Caveolin-1正常表达可以抑制cyclinD1基因启动子的活性,从而抑制cyclinD1的表达,产生细胞周期阻断。而Glait等^[15]则发现Caveolin-1能控制BRCA1基因的表达以及产物的细胞定位,而后者是恶性乳腺癌发生过程中的重



A: 转染Caveolin-1后细胞内P38磷酸化程度变化及Bax/Bcl-2表达变化; B: 转染后24小时细胞内p-Caveolin-1, Bax及Bcl-2的免疫荧光染色结果。a-c: MCF-7细胞的p-Caveolin-1染色, 红色为蛋白染色, 蓝色为染了DAPI的细胞核, 右侧图为叠加后效果(以下同); d-f: MCF-7/Caveolin-1细胞的p-Caveolin-1染色; g-i: MCF-7细胞的Bax染色; j-l: MCF-7/Caveolin-1细胞的Bax染色; m-o: MCF-7细胞的Bcl-2染色; p-r: MCF-7/Caveolin-1细胞的Bcl-2染色。标尺=20 μm。

A: P38 phosphorylation and Bax/Bcl-2 expression after transfection; B: MCF-7 cells were stained at 24 h after transfection. Red: protein staining. Blue: nuclei stained with DAPI. Right is a merged image. In image, a-c: MCF-7 cells stained with p-Caveolin-1 antibody; d-f: MCF-7/Caveolin-1 stained with p-Caveolin-1 antibody; g-i: MCF-7 cells stained with Bax antibody; j-l: MCF-7/Caveolin-1 stained with Bax antibody; m-o: MCF-7 cells stained with Bcl-2 antibody; p-r: MCF-7/Caveolin-1 stained with Bcl-2 antibody. The scale bar is 20 μm.

图4 转染Caveolin-1对MCF-7细胞凋亡通路的影响
Fig.4 The effect of Caveolin-1 in the apoptosis of MCF-7 cells

要角色。另外,也有研究发现,Caveolin-1的表达能够抑制乳腺癌细胞的非贴壁依赖性生长^[16]。这些研究都暗示了Caveolin-1在乳腺癌细胞增殖存活中可能有非常重要的作用。

本文就Caveolin-1对乳腺癌细胞系增殖和生长的作用进行了研究。运用Western blot对6种不同的乳腺癌细胞系中Caveolin-1的表达进行检测发现,除了MB-MDA-231外,其余的5种细胞中(ZR-75-30、MDA-MB-435、MDA-MB-453、MCF-7和B-CAP-37)都只有微量的Caveolin-1表达。选择MCF-7细胞系转染Caveolin-1的基因,获得的瞬时转染细胞能大量表达Caveolin-1蛋白,并能作为底物被激酶磷酸化,表明存在一定的生物活性。对转染后的细胞进行了增殖速率的检测,结果发现,与空转和未转染的MCF-7细胞相比,转染Caveolin-1的MCF-7细胞增殖率明显降低。转染后12 h内,MCF-7细胞内Bax的表达水平和P38的磷酸化逐步上升,在12 h时迅速提高,而Bcl-2的水平在12 h后反而出现下降。运用Immunofluorescence方法对转染后的细胞信号通路进行了研究,结果表明,转染24 h后MCF-7细胞内的Bax表达水平明显上升,而Bcl-2表达水平略有下降。由于Bax介导的凋亡途径受到PI3K/Akt的调控,而PI3K能与Caveolin-1产生相互作用,因此我们猜测,转染Caveolin-1后,Caveolin-1可能作为抑制乳腺癌细胞系MCF-7生长的因子,启动MCF-7细胞内Bax介导的凋亡途径,最终导致细胞凋亡,从而降低了增殖率。

Caveolin-1在许多类型的组织中都有广泛表达。在不同组织类型的癌细胞中,Caveolin-1既存在高表达,也存在低表达。而不同的组织类型中,Caveolin-1表达量升高或降低所引起的细胞效应也不尽相同。例如:Caveolin-1在食道癌、膀胱癌、前列腺癌和甲状腺癌(乳头型)中表达均升高^[17-19],而在典型的间质肉瘤、卵巢癌、肺癌及乳腺癌内Caveolin-1的表达则是下调的。在肝癌中,Caveolin-1能够抑制TRAIL诱导的细胞凋亡^[20]。在用3T3细胞进行的研究中发现,在原癌基因 ν -Abl、Bcr-Abl、H-Ras被激活的3T3细胞中,失去Caveolin-1后出现非贴壁依赖性生长,而且这种变化可以被重新表达Caveolin-1逆转,表明Caveolin-1具有抑癌因子的作用^[21]。而另有研究发现,Caveolin-1在原发和转移性前列腺癌中表达增高,暗示Caveolin-1增高可能与癌发生发展有关^[22]。Caveolin-1在癌症发生发展中的这种两面性提示,在

Caveolin-1相关信号通路和Caveolae结构功能上可能存在特异性。因此,深入研究Caveolin-1在癌症发生发展中的双重作用,对于深刻理解癌症机理、探寻癌症的新型治疗靶点有着重要意义。

致谢

我们感谢法国里尔科学技术大学的Hubert Hondermarck教授在研究过程中给予我们的指导和帮助。

参考文献 (References)

- Razani B, Schlegel A, Lisanti MP. Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt12): 2103-9.
- Couet J, Belanger MM, Roussel E, Drolet MC. Cell biology of Caveolae and Caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49(3): 223-35.
- Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of Caveolin-1. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41295-8.
- Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin proteins. *Genome Biol* 2004; 5(3): 214.
- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(1): 61-6.
- van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 2006; 16(2): 203-13.
- Sellers WR, Fisher DE. Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest* 1999; 104(12): 1655-61.
- Sotgia F, Rui H, Bonuccelli G, Mercier I, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1, mammary stem cells, and estrogen-dependent breast cancers. *Cancer Res* 2006; 66(22): 10647-51.
- Zou W, Wang X, Feng SA, Zhang H, Wang Y, Cui YY, *et al.* RNA inference-mediated Caveolin-1 down-regulation decrease estrogen receptor alpha (ER alpha) signaling in human mammary epithelial cells. *Molecular Biol Rep* 2011; 38(2): 761-8.
- Schlegel A, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, Zhang XL, *et al.* Crowded little caves: Structure and function of caveolae. *Cell Signal* 1998; 10(7): 457-63.
- Thomas CM, Smart EJ. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med* 2008; 12(3): 796-809.
- Bouras T, Lisanti MP, Pestell RG. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(10): 931-41.
- Spisni E, Tomasi V, Cestaro A, Tosatto SC. Structural insights into the function of human Caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338(3): 1383-90.
- Hulit J, Bash T, Fu MF, Galbiati F, Albanese C, Sage DR, *et al.* The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by Caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; 275(28): 21203-9.
- Glait C, Ravid D, Lee SW, Liscovitch M, Werner H. Caveolin-1 controls BRCA1 gene expression and cellular localization in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2006; 580(22): 5268-74.
- Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness

- in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(15): 2365-75.
- 17 Ando T, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Mori Y, Sugito N, *et al.* The overexpression of Caveolin-1 and Caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18(3): 601-9.
- 18 Bennett N, Hooper JD, Lee CS, Gobe GC. Androgen receptor and Caveolin-1 in prostate cancer. *IUBMB Life* 2009; 61(10): 961-70.
- 19 Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Kobayashi K, Yokozawa T, Hirai K, *et al.* Caveolin-1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma of the thyroid. *Br J Cancer* 2002; 86(6): 912-6.
- 20 Zhao X, Liu Y, Ma Q, Wang X, Jin H, Mehrpour M, *et al.* Caveolin-1 negatively regulates TRAIL-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(1): 21-6.
- 21 Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of Caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997; 272(26): 16374-81.
- 22 Yang G, Truong LD, Wheeler TM, Thompson TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: A novel prognostic marker. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5719-23.

Effect of Caveolin-1 on Proliferation and Survival of MCF-7 Breast Cancer Cells

Lu Ruisheng¹, Ma Ji¹, Zhang Yan^{1,2}, Yu Lingli^{1,2}, Ambre Spencer², David Cluet²,
Brian B. Rudkin^{1,2*}, Yuan Chonggang^{1*}

(¹*School of Life Sciences, EastChinaNormal University, Shanghai 200062, China;* ²*Differentiation & Cell Cycle Group, Cellular Molecular Biology Laboratory, UMR 5239 CNRS/ENS Lyon/University of Lyon 1, IFR 128, Bioscience Lyon-Gerland. 46, Allée d'Italie 69364 Lyon Cedex 07, France*)

Abstract We Study the effect of Caveolin-1 on the proliferation and survival in MCF-7 breast cancer cells. A very low expression level was detected by Western blot in 6 breast cancer cell lines. Caveolin-1 expression increased dramatically after transient transfection and has its biological activity. The MTT assay showed that the proliferation rate of MCF-7 cells was decreased after the transfection of Caveolin-1. The cell apoptosis relative protein was observed by Western blot and immunofluorescence. The quantity of phosphorylated P38 and the expression of Bax increased. We concluded that Caveolin-1 expression inhibited cells proliferation and survival and induces the Bax mediated cell apoptosis in MCF-7 breast cancer cells.

Key words Caveolin-1; breast cancer; proliferation and survival

Received: March 1, 2011 Accepted: June 10, 2011

This work was supported by the Shanghai International Cooperation Project (No.075407059)

*Corresponding author. Tel: 334-72-72-81-96, E-mail: bbrudkin@ens-lyon.fr; Tel: 86-21-62232729, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn