

乳腺癌中的脂联素受体 1 表达及其信号通路激活对癌细胞的作用机制研究

鲍 轶 钟征翔 崔 戈

摘 要 **目的** 探讨人能量代谢相关基因脂联素受体 1 (AdipoR1) 在乳腺癌中的表达及其信号通路激活对乳腺癌细胞的作用机制。**方法** 采用已发表的基因表达数据库数据,分析 AdipoR1 在各病理亚型中的不同表达,以及 AdipoR1 基因表达与 HER-2 表达的相关性。采用免疫印迹法(Western blotting)检测 AdipoR1 在 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR3 等 ER⁺、HER-2⁺ 及 ER⁻ 癌细胞株中的表达;采用 Western blotting 法检测 MCF-7 细胞在脂联素不同时间长度的作用下,细胞内信号蛋白 AMPK 及 S6 激酶(S6K)的活化。**结果** AdipoR1 在正常乳腺组织样乳腺癌中基因表达最低,与其他各组病理亚型乳癌有显著性差异($P < 0.05$)。在乳腺癌中,AdipoR1 基因表达与 HER-2 基因呈正相关(Pearson, $r = 0.134$)。AdipoR1 广泛表达于 ER⁺、HER-2⁺ 及 ER⁻ 乳腺癌细胞系中。在低浓度(0.5 μg/ml)脂联素作用下,AMPK 及 mTOR 的底物蛋白 S6K 在 15min 发生磷酸化活化,磷酸化信号随着时间延长而加强,30min 时信号强度达到最高峰;之后开始下降,但在 1h 仍能检测到磷酸化。**结论** AdipoR1 基因表达水平在各乳腺癌病理亚型不同,该受体在各类乳腺癌细胞株中广泛表达。乳腺癌中的脂联素信号通路激活,可活化 AMPK 及 mTOR 信号通路,从而影响肿瘤细胞的能量代谢、蛋白合成及细胞增殖过程。

关键词 乳腺癌 脂联素受体 1 基因表达 腺苷酸活化蛋白激酶 S6 激酶

Expression of Adiponectin R1 and its Signaling Pathway In Breast Cancer. Bao Yi, Zhong Zhengxiang, Cui Ge. Jiaying Second Hospital, Zhejiang 314000, China

Abstract Objective To investigate the energy metabolism-related gene adiponectin receptor 1 (AdipoR1) in breast cancer and the effects of its signaling pathway activation on breast cancer cells. **Methods** Using the published gene expression data set in database, the different gene expression of AdipoR1 were analyzed in various subtypes of breast cancer, and AdipoR1 gene expression is positively correlated with and HER-2 expression. Western blotting was used to examine the AdipoR1 protein expression in ER⁺, HER-2⁺ and ER⁻ cell lines, including MCF-7, MDA-MB-231 and SKBR3. After MCF-7 cells were exposed in the media with recombinant adiponectin in varieties of time points, the activity of AMPK kinase and S6 kinase were also examined. **Results** The gene expression of AdipoR1 was significantly low in normal breast-like breast cancer comparing with other pathological subtypes ($P < 0.05$). AdipoR1 gene expression was positively correlated with HER-2 gene in breast cancer (Pearson $r = 0.134$). AdipoR1 was widely expressed in ER⁺, HER-2⁺ and ER⁻ breast cancer cell lines. In addition, the administration of 0.5 μg/ml of adiponectin to MCF-7 cells, AMPK and S6 kinase were rapidly phosphorylated in 15min and further increased in 30min, but declined in 1h. **Conclusion** There was difference in the mRNA level of AdipoR1 in a varieties of subtypes of breast tumor tissue, and widely expressed both in ER⁺, HER-2⁺ and ER⁻ breast cancer. In tumor cells, the activation of adiponectin and its receptor signaling pathway could influence energy metabolism, protein synthesis and cell proliferation through activation of AMPK and mTOR pathway.

Key words Breast cancer; Adiponectin receptor 1; Gene expression; AMP-activated protein kinase; S6 kinase

脂联素(adiponectin)是一种由脂肪细胞分泌的生物活性物质之一,近年来被广泛研究。外周血脂联素水平与肥胖、胰岛素抵抗、动脉粥样硬化和肿瘤等相关^[1]。2003 年,Yamauchi 等^[2]发现并报道了两类

脂联素受体的存在,分别为 AdipoR1 和 AdipoR2,同时发现其广泛分布和表达于人体许多组织细胞表面,其中 AdipoR1 主要表达在骨骼肌细胞,对脂联素的球状结构域具有高亲和力,但对全长脂联素亲和力低;而 AdipoR2 主要表达在肝细胞,对两者具有中等亲和力。AdipoR1 和 AdipoR2 是包含了 7 个穿膜区域的 G 蛋白,但其 N 末端位于细胞内,而 C 末端位于细胞外,因而结构上异于传统的 G 蛋白偶联受体^[2]。脂

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101707);浙江省中医药基金资助项目(2011ZA104)

作者单位:314000 浙江省嘉兴市第二医院

通讯作者:鲍轶,电子信箱:ybao2011@gmail.com

脂素与其细胞表面的受体结合,通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、p38 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号分子激活,传递脂联素的信息,与肥胖患者在糖尿病中的胰岛素抵抗有密切的关系。最近有研究显示,肥胖患者血清脂联素水平降低还与乳腺、结肠、及前列腺组织的癌变有关^[3]。最近在对结直肠癌患者脂联素受体表达的研究中,Williams 等^[4]发现在结肠癌组织中脂联素受体表达较周围正常组织显著增加,提示脂联素受体信号通路与肿瘤细胞的能量代谢有可能相关。

本研究探讨 AdipoR1 在乳腺癌中的表达,研究该基因在不同亚型的乳腺癌其分子表达水平的差异,及与乳腺癌周围正常组织基因表达水平的差异。应用与 AdipoR1 具有高度亲和力的脂联素,作用于体外培养的人乳腺癌细胞株 MCF-7,研究其通过 AdipoR1 对 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)及 mTOR 信号通路的影响,探讨脂联素及其受体的信号通路对乳腺癌细胞的作用机制。

材料与方法

1. 主要材料:人乳腺癌细胞株 MCF-7、T47D、SKRB3、BT474 和 MDA-MB231 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC);脂联素购自美国 Biovision 公司;DMEM/F12 细胞培养液、胎牛血清、青链霉素双抗购自 Gibco 公司;AdipoR1 抗体购自美国 Abcam 公司;pAMPK、tAMPK、pSK6、SK6 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;鼠抗人 β -actin、tubulin 抗体购自美国 Sigma 公司;羊抗鼠 IgG-HRP、兔抗鼠 IgG 购自美国 Jackson Immuno Research Laboratories, Inc。

2. 基因表达数据:基因表达数据(microarray data)从 Herschkowitz 等在 2007 年发表的文献上获得^[5]。原实验样本来自北卡罗来纳大学(the University of North Carolina)新鲜组织样本库中女性乳腺癌患者癌组织。根据病理分子亚型的不同,基底样(basal-like)乳腺癌 66 例,HER-2⁺/ER⁻ 36 例,luminal A 66 例, luminal B 35 例,正常乳腺组织样(normal-breast like)16 例^[6]。

3. 细胞培养:MCF-7、T47D、SKRB3、BT474 和 MDA-MB231 细胞培养于高糖型 DMEM/F12 培养基,含 10% 灭活胎牛血清 50U/ml 青霉素和 50 μ g/ml 链霉素,放置于 5% CO₂ 37℃ 细胞培养箱中。应用 MCF-7 癌细胞株,研究重组人脂联素(recombinant adiponectin)作用于其受体后信号通路的激活对乳腺癌细胞的作用机制。在加入脂联素的前 1 天晚上,MCF-7 细胞在无胎牛血清的培养基中培养过夜。第 2 天在无胎牛血清培养基中加入 0.5 μ g/ml 脂联素,分别培养 15min、30min 及 1h 后收取细胞后做相应检测。

4. 免疫印迹法(Western blotting)检测蛋白表达:Western blotting 方法检测 AdipoR1、pAMPK、tAMPK、pS6K 和 S6K 蛋

白的表达。收集各组细胞,制备总蛋白样品,BCA 法测定蛋白浓度;蛋白样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,5% 的脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:1000),4℃ 孵育过夜。加入 HRP 标记的二抗(1:5000)室温下孵育杂交 1h,ECL 化学发光法显色。

5. 统计学方法:实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用非配对 *t* 检验法(un-paired T test),多组间比较用方差分析(One-way Anova)。图表绘制及数据统计学处理使用 Prism 3.0 软件处理(GraphPad Software, www. GraphPad. com),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AdipoR1 在不同病理亚型的乳腺癌组织中基因表达:分析 Herschkowitz 等在 2007 年发表的美国妇女乳腺癌基因表达数据库,提示 AdipoR1 在不同病理亚型各组的乳腺癌组织中基因表达有显著差异,在 normal-breast like 中的表达量最低($P < 0.05$) (图 1)。

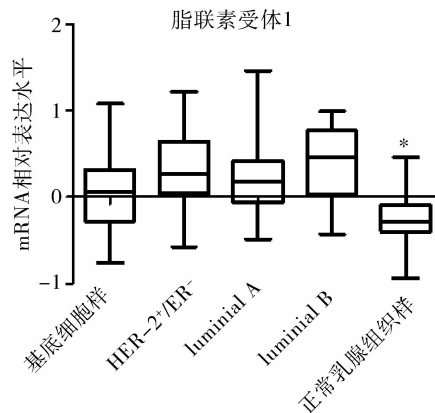


图 1 在 Herschkowitz 等在 2007 年发表的女性乳腺癌基因表达数据库中分析 AdipoR1 mRNA 在不同乳腺癌不同病理亚型的表达 (* $P < 0.05$)

2. AdipoR1 和 HER-2 基因的表达呈正相关:运用 Pearson 相关系数,在 Herschkowitz 等在 2007 年发表的女性乳腺癌基因表达数据库中,AdipoR1 和 HER-2 基因的表达的相关性。Pearson 相关系数计算的是两变量互比比例,即线性相关程度,相关系数范围在 -1~1 之间,-1 表示完全负相关,1 表示完全正相关,0 表示不相关。经计算,AdipoR1 和 HER-2 基因的表达 Pearson 相关系数 0.134,呈正相关($P < 0.05$,图 2)。

3. AdipoR1 在不同乳腺癌细胞株中的表达:应用免疫印迹法分别检测 ER⁺、ER⁻ 和 HER-2⁺ 的乳腺癌细胞株,包括 MCF-7、T47D、SKRB3、BT474 和 MDA-231 中 AdipoR1 蛋白的表达。微管蛋白(tubu-

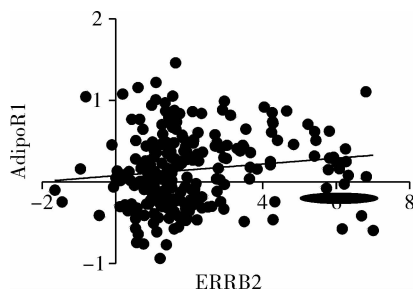


图2 使用 Pearson 相关系数分析 AdipoR1 mRNA 与 HER-2 mRNA 之间的相关性 (Pearson, $r = 0.134$)

lin) 表达作为内参。经检测, AdipoR1 蛋白信号在上述的癌细胞株中均有表达 (图 3)。

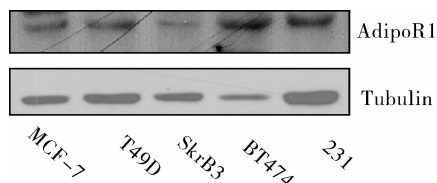


图3 Western blotting 法检测 AdipoR1 蛋白癌细胞株中的表达
tubulin 作为内参

4. 脂联素处理 MCF-7 不同时间后对 pAMPK、pS6K 蛋白表达及活性的影响: 用低浓度脂联素 ($0.5 \mu\text{g/ml}$) 在不同的时间点 (0、15、30min 和 1h) 处理 MCF-7 细胞, 采用 Western blotting 法检测 AMPK 和 S6K 在脂联素及其受体激活的过程中发生磷酸化过程。实验以 AMPK 和 S6K 磷酸化抗体为目的蛋白, 以总 AMPK、S6K 蛋白抗体及 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参蛋白。研究显示在 0min, MCF-7 在无胎牛血清的培养基中过夜培养, AMPK 和 S6K 蛋白未见明显磷酸化, 基本处于本底水平, 在加入脂联素 15min 后即可发现 AMPK 和 S6K 产生磷酸化, 30min 达到高峰, 1h 仍然可见, 但是较 30min 的磷酸化水平有所下降 (图 4)。

讨 论

脂联素及其受体在肝细胞和骨骼肌细胞介导的脂肪酸氧化和葡萄糖代谢的研究已经取得了一定进展。根据现有报道显示, 脂联素受体激活后作用于其下游的接头蛋白, 如含血小板-白细胞 C 激酶底物同源性/磷酸酪氨酸结合域和亮氨酸拉链基元 1 的接头蛋白 (adaptor protein containing pleckstrin homology, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif 1, APPL1), 依次活化肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1) 和 AMPK 等激酶蛋白后发挥生理作用^[7]。

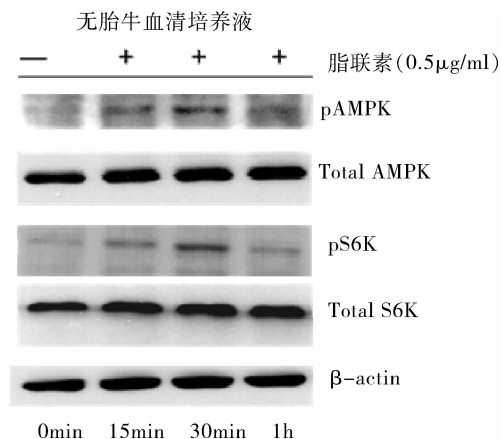


图4 Western blotting 法检测 AMPK 和 S6K 蛋白磷酸化水平
Total AMPK、Total S6K 和 β -actin 作为内参

AMPK 是细胞内对能量代谢极为敏感的蛋白激酶, 受细胞内 ATP/ADP 水平的调控^[8]。目前研究认为 AMPK 是脂联素信号转导通路中的关键信号分子, 其正常的信号转导功能, 控制体内的血糖水平及增强胰岛素敏感性, 保护血管内皮细胞抗动脉粥样硬化起到重要作用^[9]。

恶性肿瘤细胞常通过增加葡萄糖摄取和无氧糖酵解增加来维持其高增殖率。明确肿瘤细胞能量代谢机制可研发针对阻断能量供应的新型靶向治疗策略, 使肿瘤细胞处于“饥饿”状态而凋亡。脂联素信号系统是在肥胖及 2 型糖尿病中被广泛关注和研究的通路。通过分析已发表的乳腺癌基因芯片数据, 我们发现 AdipoR1 mRNA 表达水平在各组不同病理亚型的乳腺癌中存在着显著的差异性, AdipoR1 在正常乳腺组织样乳腺癌中表达最低, 并且通过对另一组在 2005 年公开发表的乳腺癌基因芯片数据进行相同分析处理, 我们亦发现 AdipoR1 的表达在肿瘤组织中较周围正常的乳腺组织显著增高 (未发表数据), 这些研究发现还和文献报道的 AdipoR1 在结直肠癌组织中较周围正常组织高表达一致^[10,4]。这些研究结果提示肿瘤细胞可能通过提高 AdipoR1 的 mRNA 使其细胞表面该受体蛋白含量增加, 并可能进一步影响细胞内糖类代谢。另外, 在肥胖患者体内脂肪细胞分泌脂联素降低, 其外周血循环脂联素浓度下降, 组织细胞特别是癌细胞可能通过某种未知的反馈性调节机制代偿性的增强 AdipoR1 的表达。

另外, 通过 Herschkowitz 等发表的基因芯片数据研究, 我们还发现 AdipoR1 和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor - 2, HER -

2) 基因的表达式有着正相关。HER - 2 (亦称 C - erbB2) 基因, 其基因拷贝数在约 30% 乳腺癌患者中增加, 并发现是与肿瘤细胞的增殖, 侵袭及转移有关的重要分子^[11]。HER - 2 受其配体影响, 在细胞表面形成二聚体而激活其下游信号通路, 包括 MAPK 细胞增殖通路及 PI₃K/AKT 细胞存活通路, HER - 2 和 AdipoR1 这两个受体表达正相关可能都与肿瘤细胞不受调控的高增殖率及抵抗细胞凋亡有关, 但目前尚不清楚二者之间是否存在直接联系。

通过研究 AdipoR1 在不同乳腺癌细胞株中的表达, 发现其 mRNA 在 ER⁺ 的癌细胞系 (MCF - 7, T47D 及 BT474)、HER - 2⁺ 的癌细胞系 (SKBR3) 以及 ER⁻ 的癌细胞系 (MDA - 231) 都有广泛表达。另外我们发现, 脂联素可以迅速影响 MCF - 7 细胞内的 AMPK 和 mTOR 下游的蛋白激酶 S6K, 其磷酸化提示 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路激活。亦有报道提示应用脂联素可以抑制前列腺癌细胞、结肠癌及胃癌细胞的增殖^[12-14]。由于 PI₃K/AKT/mTOR 是癌细胞增殖的通路, 我们考虑可能是在较生理浓度低的脂联素作用下, MCF - 7 细胞通过 AdipoR1 的活化, 可激活 mTOR 信号通路从而影响肿瘤细胞内蛋白的合成。但对于脂联素是如何激活 mTOR 信号通路仍需进一步研究。同时, mTOR 信号通路激活可增加 P21 蛋白水平, 该分子是调控细胞分裂周期的关键之一, 所以 AdipoR1 通路激活后是否影响了 P21 蛋白的表达也需进一步研究。另外, AdipoR1 在乳腺癌细胞中活化是否发挥类似在肝细胞和骨骼肌细胞中影响 GLUT4 等葡萄糖转运体的作用而提高癌细胞的葡萄糖摄入, 也需要深入研究。

综上所述, 本研究发现 AdipoR1 基因表达水平在各乳腺癌病理亚型中有差异, 在正常组织样乳腺癌中表达最低。AdipoR1 蛋白广泛表达于 ER⁺、ER⁻ 及 HER - 2⁺ 的乳腺癌中。另外, 在低浓度的脂联素作用下, 可以激活乳腺癌细胞内的 AMPK 及 S6K 等激酶, 影响肿瘤细胞能量代谢及细胞增殖。

参考文献

- Cui J, Panse S, Falkner B. The role of adiponectin in metabolic and vascular disease: a review [J]. Clin Nephrol, 2011, 75 (1) : 26 - 33

- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects [J]. Nature, 2003, 423 (6941) : 762 - 769
- Paz - Filho G, Lim EL, Wong ML, *et al.* Associations between adipokines and obesity - related cancer [J]. Front Biosci, 2011, 16 : 1634 - 1650
- Williams CJ, Mitsiades N, Sozopoulos E, *et al.* Adiponectin receptor expression is elevated in colorectal carcinomas but not in gastrointestinal stromal tumors [J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15 (1) : 289 - 299
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors [J]. Genome Biol, 2007, 8 (5) : R76
- Sotiriou, C., L. Pusztai. Gene - expression signatures in breast cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 360 (8) : 790 - 800
- Mao X, Kikani CK, Riojas RA, *et al.* APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8 (5) : 516 - 523
- Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13 (9) : 1016 - 1023
- Hosch SE, Olefsky JM, Kim JJ. APPL1 uncovers how adiponectin modulates insulin action [J]. Cell Metab, 2006, 4 (1) : 5 - 6
- Radvanyi L, Singh - Sandhu D, Gallican S, *et al.* The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (31) : 11005 - 11010
- Lin SX, Chen J, Mazumdar M, *et al.* Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions [J]. Nat Rev Endocrinol, 2010, 6 (9) : 485 - 493
- Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340 (4) : 1158 - 1166
- Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, *et al.* Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2 [J]. Cancer Sci, 2007, 98 (7) : 1120 - 1127
- Kim AY, Lee YS, Kim KH, *et al.* Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1 - and - R2 - mediated AMPK activation [J]. Mol Endocrinol, 2010, 24 (7) : 1441 - 1452

(收稿: 2012 - 01 - 05)

(修回: 2012 - 02 - 16)