

· 基础研究 ·

FAK 在雌激素诱导 MCF-10A 乳腺上皮细胞转化中的表达及其意义*

杨莉, 李阳, 朱筑霞, 王旭东[△]
(贵阳医学院生理学教研室 550004)

摘要:目的 观察 17- β 雌二醇(E2)诱导雌激素受体(ER)阴性乳腺上皮细胞 MCF-10A 转化及伴随的局部黏着斑激酶(FAK)表达变化,探讨 FAK 在细胞转化中的生物标记意义。方法 以 ER 阴性 MCF-10A 细胞为研究模型,E2 连续刺激模型细胞 5 周(共传 11 代)建立转化细胞模型,采用蛋白印迹法检测蛋白表达变化、软琼脂集落形成实验检测非贴壁依赖集落形成、伤口愈合实验检测细胞迁移及细胞胎盼蓝染色计数观察细胞生长。结果 E2 连续刺激 MCF-10A 细胞 5 周后,细胞生长速度明显增快、接触抑制性消失,细胞迁移显著增快,同时在软琼脂基质中形成集落。在 E2 诱导细胞转化早期即出现 FAK 蛋白表达增强及蛋白剪切,但乳腺癌标记分子周期蛋白 E 表达无明显变化。结论 E2 诱导 ER 阴性 MCF-10A 乳腺上皮细胞转化中始终伴随 FAK 表达变化,提示 FAK 可能成为预测 ER 阴性乳腺细胞转化的早期生物标记物。

关键词:17- β 雌二醇;黏着斑激酶;乳腺上皮细胞;细胞转化;生物标记物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2376-02

Altered expression of FAK in estrogen-transformed MCF-10A mammary epithelial cells and its significance*

Yang Li, Li Yang, Zhu Zhuxia, Wang Xudong[△]

(Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate 17 β -estradiol(E2)-induced transformation and coincident altered expression of focal adhesion kinase(FAK) in estrogen receptor(ER)-negative mammary epithelial cell line MCF-10A, so as to understand whether FAK is a potential biomarker in E2-transformed mammary cells. **Methods** MCF-10A cells were treated with E2 for 5 weeks(11 passages) to establish an E2-transformed cell model. Western blotting was used to access protein expression, soft-agar colony formation test was employed to observe anchorage-independent growth, wound healing assay was applied to observe cell migration, and Trypan blue staining and cell counting was employed to observe cell growth. **Results** After treatment of wild type MCF-10A cells with E2 for 5 weeks, the cells displayed increased proliferation, migration, and colony formation, indicating a transformed phenotype. More importantly, enhanced expression and proteolysis of FAK was noticed during the progression of E2-induced transformation. **Conclusion** E2-induced transformation of ER-negative MCF-10A breast epithelial cells is accompanied by altered expression of FAK, indicating FAK as a potential early biomarker for transformed ER-negative breast cells.

Key words:17 β -estradiol; focal adhesion kinase; mammary epithelial cells; transformation; biomarker

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,随着社会的快速发展其发病率还将继续攀升^[1-2]。因此,通过特异性生物标记分子早期预测乳腺癌风险具有重要的理论和实际意义。局部粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)可作为乳腺癌和子宫内腺癌等恶性肿瘤的生物标记物^[3-4],但其临床意义尚存在争议^[3-5]。大量研究表明,17- β 雌二醇(17 β -estradiol, E2)是诱导乳腺癌变的关键因素^[6-7],而细胞癌变往往需要经过漫长的细胞转化阶段才能完成。本研究旨在观察 E2 诱导乳腺上皮细胞转化过程中 FAK 的变化并探讨其意义,为深入研究乳腺癌风险的早期预测提供实验依据,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 MCF-10A 细胞由重庆第三军医大学生物化学教研室惠赠;马血清、DMEM/F12 和青/链霉素购自美国 HyClone 公司;E2、霍乱毒素、胰岛素、氯化可的松和 DMSO 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;FAK 和周期蛋白 E 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,ER- α 抗体购自美国 Epitomics 公司;低熔点琼脂粉购自美国 Lonza 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-10A 细胞培养于终浓度含 10% 马血清,10 ng/mL 霍乱毒素,10 μ g/mL 胰岛素,50 ng/mL 氯化可

的松,20 ng/mL EGF,1% 青/链霉素的 DMEM/F12 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C、体积浓度为 5% 的 CO₂ 孵箱中培养,每周传代 2 次,末次传代后 24 h 活细胞达 85% 以上者用于后续实验。

1.2.2 细胞转化实验 野生型 MCF-10A 细胞分为对照组(0.1% 二甲亚砜),实验组(E2 溶于二甲亚砜 50 nmol/L)在上述培养液中培养 5 周,每周传 2 代,共传 11 代(P-1~P-11),观察细胞转化情况。细胞转化主要标志:非贴壁依赖集落形成、细胞生长加速及细胞迁移加快。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移 细胞接种于 12 孔板中培养至 100% 满度,用灭菌移液器枪头在单层细胞上划痕,以磷酸盐缓冲液(PBS)彻底漂洗 3 次,置倒置显微镜下拍照(0 h),然后加入上述培养液(撤出血清)继续培养,分别于第 12、24 小时观察划痕愈合情况并拍照。每张照片上随机选 3 个点测量划痕宽度并计算其平均值。划痕愈合指数=(初始划痕宽度-愈合后划痕宽度)/初始划痕宽度。实验反复 3 次。

1.2.4 软琼脂克隆实验检测细胞非锚定依赖性生长 配制 0.6% 和 1.2% 琼脂糖溶液,40 $^{\circ}$ C 水浴保存备用。将琼脂糖溶液与等体积含有 2 \times DMEM/F12,20% 马血清,200 U/mL 青/链霉素培养基混合,使之成为分别含有 0.3% 和 0.6% 琼脂糖的混合液,0.22 μ m 过滤器过滤除菌后。将 0.6% 琼脂糖的

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860093);贵州省科技教育优秀人才专项基金资助项目[黔省专合字 2008-56]。作者简介:杨莉(1978~),讲师,硕士,主要从事内分泌生理及肿瘤生物研究工作。 [△] 通讯作者, Tel:(0851)6908758; E-mail:xdwang@gmc.edu.cn。

混合液按 1 毫升/孔铺于 6 孔培养板中,制备底层胶,置室温凝固备用。细胞培养至 70%~80% 满度时,胰蛋白酶消化制备单细胞悬液。分别取 5×10^3 个细胞/毫升与含 0.3% 琼脂糖的混合液混合制备成单细胞悬液。按 1 毫升/孔将其接种于已经凝固的底层胶上,室温孵育 60 min,然后置 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 孵箱中培养。每周补充 0.5 mL 含 5% 马血清的 DMEM/F12,培养 4 周。计数细胞集落(细胞数大于 50 个)形成数。细胞集落形成率=(细胞集落形成数/接种细胞数) \times 100%。

1.2.5 细胞生长曲线 分别收集对照组和实验组细胞,胰蛋白酶消化,制备单细胞悬液,细胞计数后接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 10^4 个细胞/200 微升,每组做 3 个复孔。每 24 h 收集细胞,台盼蓝染色进行活细胞计数(连续计数 5 d),绘制细胞生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

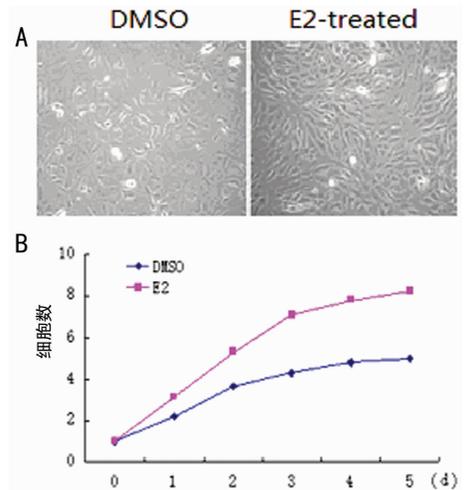
2 结果

2.1 E2 诱导 MCF-10A 细胞形态变化及细胞生长加速 显微镜下观察,对照组细胞呈单层排列,而实验组细胞胞体变大,胞内出现黑色颗粒,细胞排列紊乱,呈交叉重叠生长(图 1A),同时实验组细胞增殖速度明显快于对照细胞(图 1B)。

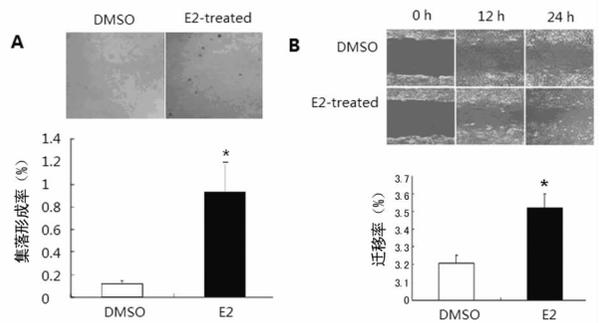
2.2 E2 诱导 MCF-10A 细胞锚定非依赖性集落形成及迁移增快 在第 11 代(转化)细胞可见集落形成能力增强。对照组和实验组克隆形成率分别为 0.12% 和 0.93%,处理组集落成率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示细胞获得非贴壁依赖性生长能力(转化的核心标志)。此外,实验组细胞在划痕 24 h 后“伤口”内迁移数量明显增多,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.3 E2 诱导 MCF-10A 细胞 FAK 表达增强和蛋白剪切 观察 E2 刺激后第 5 代细胞,但未发现 ER- α 蛋白表达(MCF-7 为阳性对照,图 3A)。E2(1~50 nmol/L)刺激细胞 48 h 后即可见 FAK 表达上调,但量效关系不明显;观察第 3、5 代细胞发现,E2 处理组细胞出现呈剂量依赖性 FAK 表达上调和蛋白剪

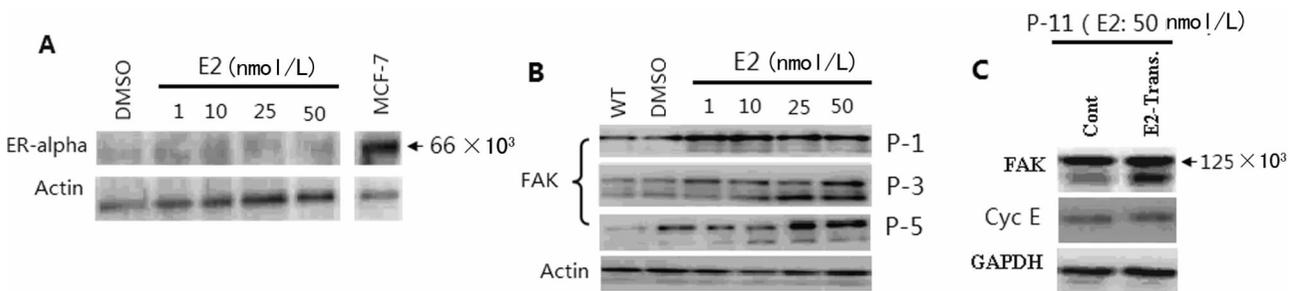
切(图 3B)。转化细胞(P15)仍可见 FAK 表达增强和蛋白剪切,但周期蛋白 E 表达无明显变化(图 3C)。



A: 显微观察; B: 细胞生长曲线。
图 1 MCF-10A 细胞形态变化和生长



A: 细胞集落形成; B: 细胞迁移。
图 2 E2 转化细胞迁移增快及细胞集落形成



A: E2 对细胞 FAK 的影响; B: 转化细胞 FAK 变化(WT 为野生型); C: 周期蛋白 E 表达无期明显变化。

图 3 E2 诱导 MCF-10A 细胞转化伴随 FAK 表达变化及蛋白剪切

3 讨论

采用 ER 选择性调节剂它莫昔芬(TAM)预防 ER 阳性乳腺癌可获得较好的效果,但对防治 ER 阴性乳腺癌无效,提示 E2 可通过 ER 或非 ER 路径诱发细胞转化和癌变。本研究采用 E2 连续刺激细胞 5 周,成功建立了 E2 诱导的 ER 阴性乳腺上皮细胞转化模型;细胞增殖加速(图 1)、细胞迁移增快及锚定非依赖性集落形成(图 2),后者被认为是细胞成瘤性转化的重要生物学指标^[8]。有文献报道,酒精具有雌激素样活性^[9],且可刺激 ER 阴性裸鼠的 ER- α 表达上调^[10],故本研究观察了 E2 对 MCF-10A 细胞 ER- α 表达的可能影响。结果发现,在 E2 刺激过程中细胞 ER- α 表达始终保持沉默(图 3A)。结果提

示,E2 诱导 MCF-10A 细胞转化与 ER- α 途径无关,并有助于解释为何 TAM 不能预防 ER 阴性乳腺癌,不过 E2 诱导 MCF-10A 细胞转化的受体机制尚有待进一步研究。

FAK 属于胞内非受体酪氨酸蛋白激酶,是细胞信号传导的重要成员之一,与细胞内其他信号转导通路之间存在串话,直接参与细胞多种功能的调节。在包括乳腺癌在内的多种肿瘤中 FAK 表达明显增加^[3-4],因而被认为在肿瘤形成中发挥重要作用。然而,目前对肿瘤组织中 FAK 的研究多采用免疫组化方法,无法了解 FAK 分子量的变化。此外,在 E2 诱导乳腺细胞恶性转化中,也未对 FAK 表达的变化进行动态观察^[12]。本研究采用蛋白印迹法,观察 E2 刺(下转第 2408 页)

会给急诊建设工作带来益处。

本研究结果发现,急诊工作中急诊内科、外科和神经内科、外科所占的比例较大,工作强度高。研究表明,心脑血管疾病在急诊发病率所占的比例较大^[6]。应根据临床需求提高急诊内科、外科和神经内科、外科的资源配置,以提高科室工作效率和保障患者抢救的成功率。抢救患者中直接住院患者 2 770 例,占 39.80%;抢救无效死亡患者 89 例,占 1.19%;出院患者 3 593 例,占 51.60%;自动出院患者 508 例,占 7.20%。急诊抢救患者间的分流情况存在明显差异($P < 0.05$)。结合患者分流情况的差异,住院患者所占比例最大,应合理的增加病床的数量,确保急诊患者的住院床位。

加快急诊抢救患者的流出速度是缓解急诊工作压力的重要措施:(1)要提高抢救的有效率;(2)根据国外的经验方法可以提高病床利用率和增加病床数^[7];(3)加强急诊发病率高的疾病的救治,如心脑血管疾病、创伤性疾病等^[8-9]。另外,对急诊抢救患者后期进行健康教育,加强心理干预,减少患者因滞留在医院的时间较长而预后差^[10-12]。

缓解急诊工作压力不仅要提高医护工作者的诊断治疗水平,加强责任心,有效的抢救急诊患者,更要根据急诊抢救患者的构成和分流情况,有计划的调整医疗资源,最大限度的合理分配资源,调整急诊功能结构,并提高病床的利用率^[13]。除了关注本院的急诊患者情况,还应放眼本地区的急诊患者分布情况,全面调整急诊患者处理的流程,实现社区医院-大型医院的急诊流程。全面协调完善急诊建设,保证急诊工作正常运转。

参考文献:

- [1] Handel DA, Hilton JA, Ward MJ, et al. Emergency department throughput, crowding, and financial outcomes for hospitals[J]. *Acad Emerg Med*, 2010, 17(8): 840-847.
- [2] 李夏昀,赵芳芳. 急诊抢救患者 420 例临床分析[J]. *山东*

医药, 2011, 51(1): 92.

- [3] 鲁德生,邵翔,张均,等. 大型综合医院急诊学科建设和发展的相关思考[J]. *江苏卫生事业管理*, 2011, 22(124): 49-50.
- [4] 刘丹,张谦. 我院院前急救与院内急救衔接的现状分析及探讨[J]. *中国急救医学*, 2011, 31(10): 944-945.
- [5] 陈东,胡鸿和. 急诊死亡病例回顾性分析[J]. *湖南师范大学学报:医学版*, 2011, 8(4): 68-70.
- [6] 李美凤,李智华,刘惠萍. 江门地区季节变化对心脑血管病患者急诊的影响[J]. *国际医药卫生导报*, 2011, 17(12): 1467-1470.
- [7] Howell E, Bessman E, Marshall R, et al. Hospitalist bed management effecting throughput from the emergency department to the intensive care unit[J]. *J Crit Care*, 2010, 25(2): 184-189.
- [8] 赵东阳,胡玉震. 80 例急诊患者的临床分析[J]. *中国卫生产业*, 2012, 36(3): 260-261.
- [9] 宋亚南. 急诊创伤外科的发展及救护[J]. *中国医药导报*, 2012, 14(326): 54.
- [10] 王立辉. 急诊留观患者的健康教育[J]. *中国基层医药*, 2012, 19(29): 130-131.
- [11] 刘晓萍. 急诊病人的心理护理[J]. *黑龙江医药*, 2008, 32(4): 59.
- [12] 潘永军,程伟,黄捷,等. 梗阻性急性肾功能衰竭 118 例病因分析及急诊处理[J]. *重庆医学*, 2012, 41(7): 671-675.
- [13] 刘霖. 急诊患者的病情程度与处置状态研究[J]. *中国急救医学*, 2011, 31(10): 937-939.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-21)

(上接第 2377 页)

激细胞过程中 FAK 蛋白的动态变化,发现 ER 阴性乳腺上皮细胞在 E2 刺激 24 h(P-1)后即可出现 FAK 表达上调,但未见蛋白剪切现象;E2 刺激至 P3 或 P5 时,除了 FAK 表达上调外,还可见 FAK 蛋白剪切(图 3B)。细胞发生转化后(P-11),FAK 表达增加及蛋白剪切依然十分明显,但乳腺癌预后标记物周期蛋白 E 表达无变化(图 3C)。本研究提示,FAK 可能是 E2 诱导 ER 阴性乳腺细胞转化的早期生物标记分子,并可为乳腺癌风险早期预测的深入研究提供实验依据。

参考文献:

- [1] Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern[J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(5): 315-318.
- [2] Linos E, Spanos D, Bernard AR, et al. Effects of reproductive and demographic changes on breast cancer incidence in china: A modeling analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(19): 1352-1360.
- [3] Oktay MH, Oktay K, Hamele-Bena D, et al. Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(3): 240-245.
- [4] Madan R, Smolkin MB, Cocker R, et al. Focal adhesion proteins as markers of malignant transformation and prognostic indicators in breast carcinoma [J]. *Hum*

Pathol, 2006, 37(1): 9-15.

- [5] Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4): 613-618.
- [6] Russo J and Irma H. Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 102(1/5): 89-96.
- [7] Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making tumor cells [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(20): 1593-1603.
- [8] Kastrati I, Edirisinghe PD, Hemachandra LP, et al. Raloxifene and desmethylarozifene block estrogen-induced malignant transformation of human breast epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27876.
- [9] Hou J, Wang X, Li Y, et al. 17beta-estradiol induces both up-regulation and processing of cyclin E in a calpain-dependent manner in MCF-7 breast cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6): 892-896.
- [10] Wong AW, Dunlap SM, Holcomb VB, et al. Alcohol promotes mammary tumor development via the estrogen pathway in estrogen receptor alpha-negative HER2/neu mice[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36(4): 577-587.

(收稿日期:2013-03-20 修回日期:2013-05-12)