

Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines

Mikako Takeshima, Misaki Ono, Takako Higuchi, Chen Chen, Takayuki Hara and Shuji Nakano

Graduate School of Health and Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University, Fukuoka, Japan

«Наука о раке»

Японская ассоциация по исследованию рака

Антипролиферативная и апоптозиндуцирующая активность ликопина в отношении трех подтипов линий клеток рака молочной железы.

Микако Такешима, Мисаки Оно, Такако Хигучи, Чен Чен, Такаяки Хара и Сюдзи Накано

Высшая школа здравоохранения и диетологии, университет Накамура Гакуэн, Фукуока, Япония

Хотя уже было предложено, что Ликопин, основной компонент каротиноидов в помидорах, снижает риск рака молочной железы, лежащий в основе этого превентивный механизм еще предстоит определить. Кроме того, неизвестно, есть ли какие-либо различия в активности ликопина по отношению к различным типам клеток рака молочной железы. Используя ER/PR положительные MCF-7, HER2-положительные SK-BR-3 и трижды негативные MDA-MB-468 клеточные линии, мы исследовали клеточный и молекулярный механизм противоопухолевой активности ликопина. Непрерывное применение ликопина в течении 168 часов показало зависимость от времени и дозы антипролиферативную активность в отношении этих клеточных линий путем купирования клеточного цикла в фазе G_0/G_1 в физиологически достижимых концентрациях, обнаруженных в плазме крови человека. Наибольшее торможение роста наблюдалось в линии MDA-MB-468, где суб- G_0/G_1 апоптотная популяция была значительно увеличена с явным расщеплением ПАРП (PARP). Ликопин вызвал сильную и длительную активацию ERK1/2 с сопутствующим подавлением циклина D1 и активацией p21 в этих трех линиях клеток. В трижды негативных клетках ликопин ингибировал фосфорилирование протеинкиназы B и нижестоящей молекулы mTOR, что в свою очередь приводило к последующей активации проапоптотного Bax без влияния на антиапоптотную Bcl-xL. В совокупности эти данные показывают, что преобладающая противораковая активность ликопина в клетках линии MDA-MB-468 предполагает потенциальную роль ликопина для профилактики трижды негативного рака молочной железы.

Материалы и методы (краткая версия)

Клеточная культура и химические вещества. Исследование проводилось в отношении трёх подтипов клеточных линий рака молочной железы, включая: положительные к гормональным рецепторам (рецепторы ER/PR) MCF-7, отрицательные к гормональным рецепторам, однако HER2-положительные SK-BR-3, трижды негативные MDA-MB-468,

Результаты (краткая версия)

Таб. 1. Значения IC₅₀ ликопина, используемого в течение различных периодов времени

Клеточная линия	IC ₅₀ ликопина (мкмоль)		
	72 ч	120 ч	168 ч
MCF-7	42,8 ± 11,9	30,0 ± 3,5	29,9 ± 3,7
SK-BR-3	41,0 ± 10,4	32,9 ± 7,3	22,8 ± 2,9
MDA-MB-468	41,7 ± 5,6	21,8 ± 4,1	10,3 ± 0,4

Влияние ликопина на клетки рака молочной железы человека

Коэффициент выживания (%)

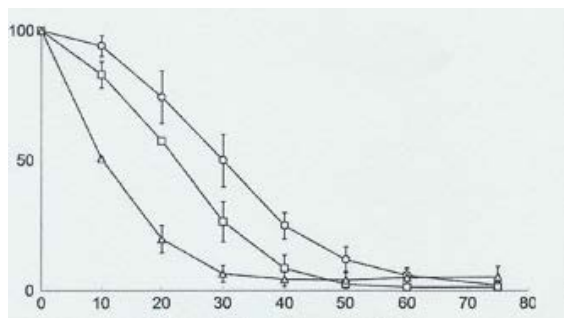


Рис. 1. Кривые выживания для ликопина в отношении клеток MCF-7 (о), SK-BR-3 (□) и MDA-MB-468 (Δ).

Концентрация ликопина (мкмоль)

Рис. 2. Анализ периода действия ликопина на прогрессию клеточного цикла и апоптоз.

Время введения ликопина (ч)

Фаза клеточного цикла

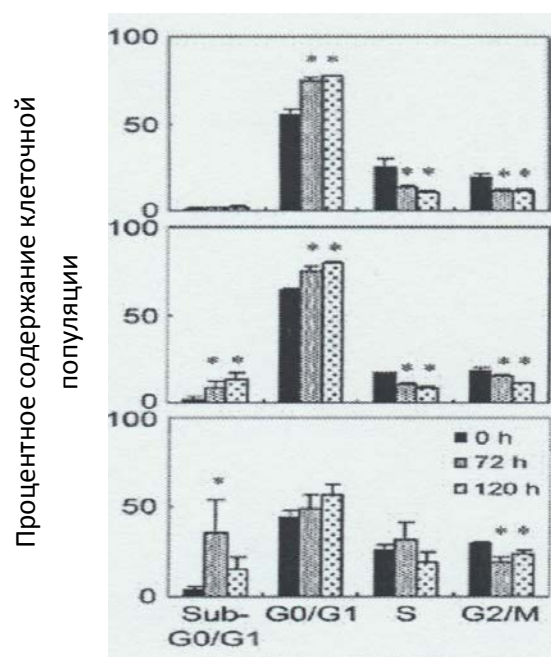
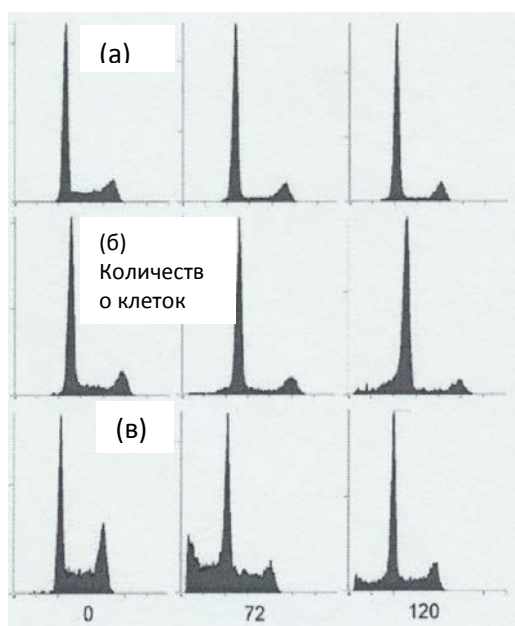
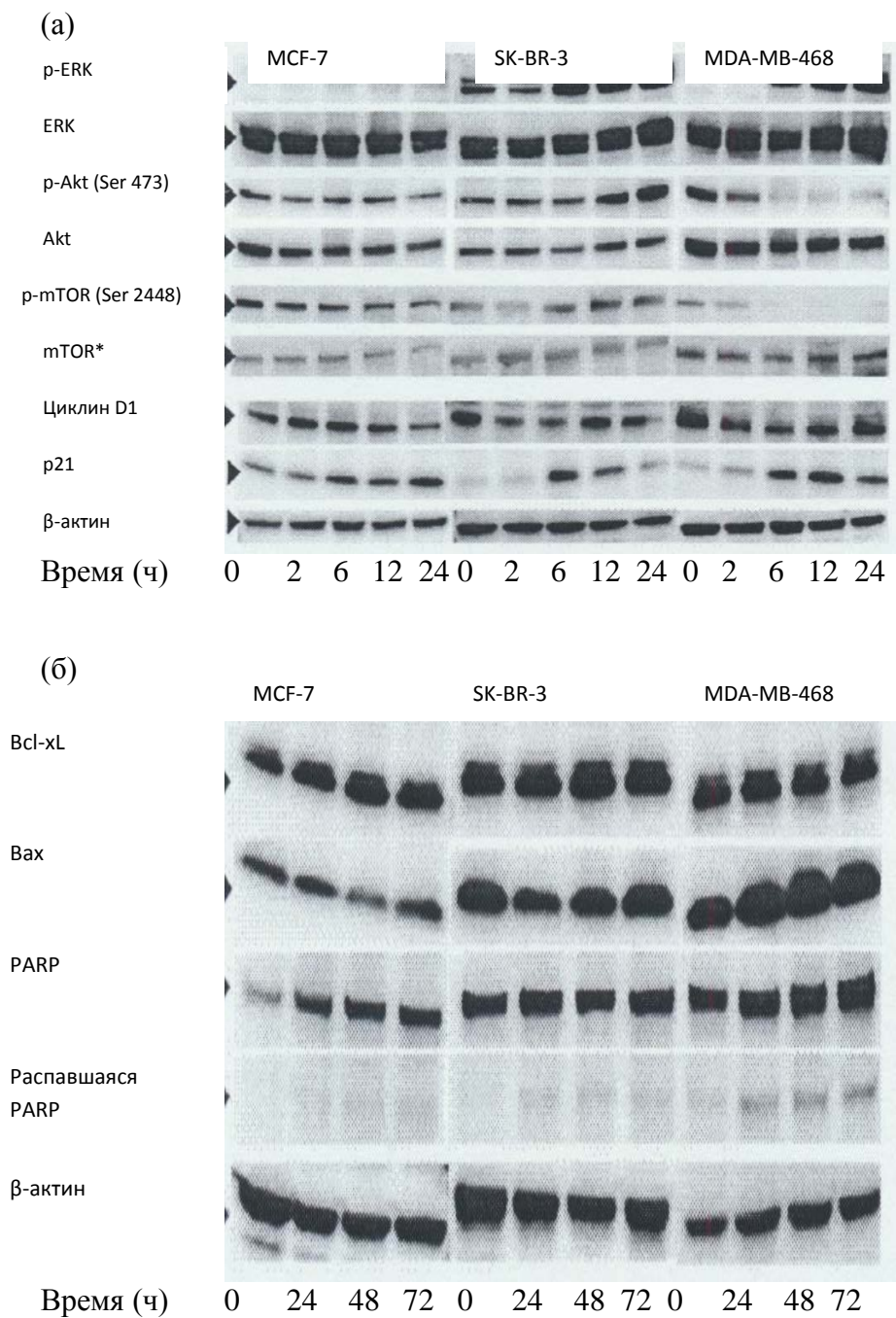


Рис.3. Действие ликопина на активацию сигнальных молекул для пролиферации и выживания клеток.



Обсуждение

В данном исследовании мы изучали активность ликопина ингибировать рост в отношении трёх клеточных линий рака молочной железы, которые отличаются статусом гормональных и HER2 рецепторов. После введения ликопина наблюдалась зависимость от времени и дозы активность по ингибированию роста, наибольшее ингибирование наблюдалось в трижды негативных клетках MDA-MB-468 при обработке клеток непрерывно в течение 168 часов, подчеркивая необходимость соответствующего длительного периода инкубации для выявления действующей цитотоксичной активности для отдельных клеточных линий. Возможно, это обусловлено цитостатической природой ликопина, который требует существенного времени для альтерации матричной РНК или белка, чтобы продемонстрировать окончательную гибель клеток. Соответственно, суб-G₀/G₁ апоптотная фракция стала заметной после воздействия ликопина в течение 72 ч (Рис. 2) несмотря на возникновение изменений в уровне экспрессии протеина после 6 или 24 часов воздействия (Рис. 3). Более того, между началом апоптоза и фактической цитотоксичностью наблюдалась диссоциация. В данном эксперименте использовался анализ WST, который позволяет измерить уровень активности сукцинатдегидрогеназы в цитоплазме, в то время как апоптотная активность измерялась посредством интенсивности флуоресценции, что отражает размер ядра. Поскольку возможно, что клетки с меньшим размером ядра (апоптотные клетки) могут все еще обладать определенным уровнем активности сукцинатдегидрогеназы, данные дифференциальные методы определения могут вызвать задержку между апоптотными событиями и цитотоксичностью, особенно если соединения имеют цитостатическую, а не цитоцидную активность.

Поскольку фактическая концентрация ликопина в 100 мкмоль ликопиновой среды составляет 4,47 мкмоль, рассчитанное значение IC₅₀ для MCF-7 составляет 1,3 мкмоль, для SK-BR-3 - 1,0 мкмоль и 0,5 мкмоль для MDA-MB-468. Это демонстрирует аналогичные значения IC₅₀ ликопина, обнаруженные в различных видах клеток рака молочной железы человека.^(21, 23-27) Подсчитанное нами значение IC₅₀ для MDA-MB-468 является физиологически достижимой концентрацией ликопина, поскольку средние уровни ликопина часто обнаруживаются в этом диапазоне в плазме человека.⁽³¹⁾ Это наводит на мысль, что регулярное введение ликопина может приводить к таким его уровням в плазме, чтобы вполне вероятно воздействовать на рост трижды негативных клеток рака молочной железы. Подобная физиологически достижимая концентрация ликопина стимулирует апоптоз в клетках рака простаты⁽²⁴⁾, а также проведен ряд клинических исследований, в ходе которых были достигнуты определенные клинические результаты.⁽³²⁻³⁴⁾ Таким образом, клиническая оценка ликопина подтверждена для пациентов с раком молочной железы. Более того, в исследованиях на животных использование ликопина способствовало сокращению формирования опухоли молочной железы у крыс, индуцированной 7,12-диметил-бенз[а]антраценом.⁽¹⁷⁾ Эти исследования наряду с предоставленными данными свидетельствуют о профилактическом и лечебном действии ликопина в отношении рака молочной железы человека. Для того чтобы удостовериться в профилактической роли ликопина, в настоящее время мы проводим испытания на животных с использованием модели опухоли молочной железы у крыс, индуцированной этилметансульфонатом, как описано в исследовании хемопревенции.⁽³⁵⁾

Эпидемиологические исследования свидетельствуют о потенциальной профилактической и противоопухолевой активности алиментарного ликопина в отношении рака молочной железы. Было обнаружено, что ликопин сокращает риск рака молочной железы в целом более выражено, чем другие каротиноиды, а также, хотя и незначительно, сокращает риск рецептор-негативного рака молочной железы, но не рецептор-положительного рака молочной железы.⁽¹²⁾ Мы также установили, что HER2-положительные/рецептор-негативные SK-BR-3 клетки умеренно чувствительны к ликопину.

Таким образом, наши результаты подтверждают гипотезу о том, что ликопин в качестве превентивного фитохимического соединения потенциально приемлем при раке молочной железы в целом и, в особенности, при ER-негативном раке молочной железы, включая HER2-положительный и трижды негативный рак. В случае с ER-положительным раком молочной железы уровень эстрогена, вероятно, является важнейшим фактором, и поэтому может перекрывать профилактический эффект ликопина. Тем не менее, концентрация эстрадиола в культурной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку, незначительна (данные не указаны). Таким образом, нужны дополнительные исследования для определения потенциальных механизмов, вызывающих пониженную чувствительность ликопина к рецептор-положительным клеткам.

Контрольные точки клеточного цикла выступают в качестве важных контрольных механизмов, обеспечивающих правильность течения фаз клеточного цикла. Согласно предыдущим исследованиям, ликопин вызывает G_0/G_1 арест клеточного цикла, что подтверждается деактивацией циклина D1 и/или активацией p27 в толстой кишке⁽²²⁾, простате⁽²³⁾ и в гормонозависимых клетках рака молочной железы⁽²⁵⁾. В настоящем исследовании ликопин увеличивал клеточную популяцию в фазе G_0/G_1 в схожей степени для этих трёх клеточных линий независимо от статуса гормональных и HER2 рецепторов и уменьшал экспрессию циклина D1, который функционирует как ключевой регулятор контрольной точки клеточного цикла G_0/G_1 , с последующим увеличением белка p21. Данные сведения свидетельствуют о том, что ликопин вызывает остановку клеточного цикла на фазе G_0/G_1 посредством уменьшения экспрессии циклина D1 и деактивации p21. Были достигнуты аналогичные результаты, когда клетки были синхронизированы в условиях сывороточного голодания и рестимулировались добавлением сыворотки: ликопин-индуцировал арест клеточного цикла на фазе G_0/G_1 посредством сокращения уровня циклина D1 и удержания p27 в гормонозависимых клеточных линиях рака молочной железы человека MCF-7 и T-47D.⁽²⁵⁾ Наши данные вместе с результатами предыдущих исследований предполагают, что арест клеточного цикла в фазе G_0/G_1 посредством деактивации циклина D1 и/или активации p21/p27 может быть универсальным событием, вызванным введением ликопина, происходящим независимо от статуса гормональных и HER2 рецепторов.

Молекулярный механизм остановки клеток ликопином в фазе G_0/G_1 остаётся неизвестным. Тем не менее, повышение конститутивной активности ERK1/2 (регулируемая внеклеточными сигналами киназа) в общем может вызвать индуцированное ликопином блокирование фазы G_0/G_1 . ERK1/2 является важным подсемейством MARK (митоген-активируемой протеинкиназы), контролирующим широкий спектр клеточной активности и физиологических процессов. Активация ERK1/2 в общем характеризуется пролиферативной способностью, однако при определённых условиях ERK1/2 характеризуется антипролиферативной активностью посредством ареста клеточного цикла G_1 .⁽³⁶⁾ Активная ранняя фаза сигнализации ERK1/2, за которой следует умеренная длительная фаза, приводит к переходной индукции p21 и аккумуляции циклина D1, обеспечивая прогрессирование G_1 . Тем не менее, активная и продолжительная активация ERK1/2 вызывает остановку G_1 из-за продолжительной индукции p21 и ингибирования Cdk2 (циклин-зависимой киназы 2)⁽³⁶⁾. В настоящем исследовании длительное введение ликопина вызвало увеличение конститутивной активности ERK1/2 с 6 ч, которая сохранялась на высоком уровне в условиях индукции p21 в течение более 24 ч в вышеуказанных трёх клеточных линиях. Таким образом, индуцированная ликопином сильная и продолжительная активация пути обмена ERK может вызвать блокирование клеточного цикла в фазе G_0/G_1 в клетках рака молочной железы независимо от статуса гормональных и HER2 рецепторов.

Нами впервые было обнаружено, что активность ликопина по ингибированию роста опосредована различными механизмами действия, зависящими от статуса гормональных и HER2 рецепторов. Индукция апоптоза была значительно более выраженной в трижды негативных клетках, чем в гормоно- и HER2-положительных клетках. В трижды негативных клетках фосфорилирование Akt и mTOR подверглись выраженному ингибированию ликопином, однако этого не наблюдалось в гормон- и HER2-положительных клетках, где ингибирование апоптоза ликопином не было обнаружено или проявлялось в крайне низкой степени выраженности. Akt играет крайне важную роль в контроле выживаемости и апоптоза посредством прямого фосфорилирования mTOR, тем самым индуцируя сигналы, ведущие к путям антиапоптоза. Таким образом, наши данные предполагают, что ликопин может оказывать апоптозное воздействие преимущественно посредством блокирования сигнальных путей, опосредованных Akt/mTOR в трижды негативных клетках рака молочной железы. Кроме того, ликопин не влияет на экспрессию антиапоптозного Bcl-xL во всех клеточных линиях, в то время как экспрессия проапоптозного Bax-протеина была увеличена только в трижды негативных клетках. Эти данные предполагают, что активация Bax может быть причиной вызванной ликопином апоптозной индукции в трижды негативных клетках. Имеются сведения об индуцированном ликопином апоптозе в отношении клеточных линий рака простаты и толстого кишечника посредством подавления сигнального пути Akt. ⁽²²⁻²⁴⁾ Согласно последним данным, ликопин индуцирует апоптоз в андрогенозависимых клетках аденокарциномы простаты человека (LNCaP) посредством сокращения фосфорилирования Akt и увеличения соотношения проапоптоза к ингибитору апоптоза-2 (Bax:Bcl-2). ⁽³⁸⁾ Таким образом, настоящее исследование является первым отчетом, демонстрирующим роль проапоптоза Bax как возможной причины индуцированного ликопином апоптоза посредством деактивации фосфорилирования Akt и ее нижестоящей молекулы mTOR в трижды негативном раке молочной железы.

Хотя наблюдения проводились в отношении отдельной репрезентативной клеточной линии, полученной из трёх подтипов рака молочной железы, наши данные четко предполагают, что доминирующая противоопухолевая активность ликопина в отношении трижды негативных клеток рака молочной железы может быть вызвана не только арестом развития клеточного цикла в фазе G₀/G₁, но и индукцией апоптоза, вероятно вызванной активацией проапоптоза Bax, тем самым подтверждаются эпидемиологические данные о потенциальной роли ликопина в профилактике данного подтипа рака молочной железы.

- ▶ **Ликопин оказывает антипролиферативную активность в отношении клеточных линий рака молочной железы путем купирования клеточного цикла в фазе G₀/G₁;**
- ▶ **Ликопин стимулирует апоптоз.**
- ▶ **Ликопин эффективен для профилактики трижды негативного рака молочной железы.**

Список литературы – см. в первоисточнике. Ссылка на первоисточник:
Cancer Science | March 2014 | vol. 105 | no. 3 | 252–257
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.12349/full>