论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0458-04

HSP90表达对乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响

邓华瑜,罗红霞,范维珂 (重庆医科大学病理生理学教研室,重庆 400016)

提 要: 目的 研究HSP90的表达与乳腺癌细胞侵袭转移能力的相关性。**方法** 采用RT-PCR和Western blot检测HSP90在MDA-MB-435s和MDA-MB-231细胞中mRNA水平和蛋白质水平的表达差异。Transwell小室人工重组基底膜侵袭迁移实验检测经HSP90抑制剂Geldanamycin(GA)处理前后两株细胞侵袭迁移能力的改变。**结果** MDA-MB-435s细胞中HSP90α的mRNA表达水平明显高于MDA-MB-231细胞($P<0.01$),MDA-MB-435s和MDA-MB-231细胞中HSP90β的mRNA表达水平没有明显差异($P>0.05$),MDA-MB-435s细胞中HSP90的蛋白质表达水平明显高于MDA-MB-231细胞($P<0.01$)。两株细胞用药前侵袭迁移能力无明显差异($P>0.05$),HSP90的抑制剂GA对MDA-MB-435s和MDA-MB-231细胞的侵袭迁移能力均呈现明显抑制作用($P<0.01$, $P<0.05$),对MDA-MB-435s细胞的抑制作用更明显($P<0.01$)。**结论** HSP90的表达影响乳腺癌细胞侵袭转移能力。

关键词: 乳腺癌细胞株; HSP90; 侵袭转移

中图法分类号: R341; R73-37; R737.9 **文献标识码**: A

Correlation between HSP90 and invasion and metastasis of human breast cancer cell line

DENG Hua-yu, LUO Hong-xia, FAN Wei-ke (Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the HSP90 expression and invasion and metastasis potential of human breast cancer cell line. **Methods** The mRNA expression level of HSP90 was detected by RT-PCR. The protein expression level of HSP90 was measured by Western blotting. The effects of HSP90 inhibitor Geldanamycin (GA) on the invasion and motility abilities of human breast cancer line MDA-MB-231 and MDA-MB-435s *in vitro* were explored by transwell chamber. **Results** The mRNA expression level of HSP90α in MDA-MB-435s cell was higher than that of MDA-MB-231 cell ($P<0.01$). The mRNA expression level of HSP90β had no difference ($P>0.05$) between the two cell lines. The protein expression level of HSP90 in MDA-MB-435s cell was higher than that of MDA-MB-231 cell ($P<0.01$). The invasive and metastatic potential in human breast cancer cell MDA-MB-435s and MDA-MB-231 had no difference ($P>0.05$). After treated with GA, the invasive and metastatic potential in human breast cancer cell MDA-MB-435s and MDA-MB-231 was suppressed significantly ($P<0.01$, $P<0.05$), but the effects of HSP90 inhibitor GA on invasive and metastatic potential of MDA-MB-435s cell was more significant than that of MDA-MB-231 cell ($P<0.01$). **Conclusion** The abilities of invasion and metastasis of breast cancer cells are related to the expression of HSP90.

Key words: breast cancer line; HSP90; metastasis

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,转移扩散是其预后不良的重要原因,一些乳腺癌患者局部肿瘤控制多年后,仍可发生血行转移[1]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)90是一种重要的分子伴侣[2],近年来研究表明它可与乳腺癌细胞中的一些信号分子和激酶结合形成复合物,从而可以参与调控乳腺癌的侵袭转移能力。本研究采用RT-PCR和Western blot技术以及Transwell小室人工重组基底膜侵袭、运动实验探讨HSP90的表达对乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响。

基金项目:重庆医科大学创新基金资助项目(cx200319)
Supported by the Research Foundation For Innovation of Chongqing University of Medical Sciences (cx200319)

作者简介:邓华瑜(1954-),女,江西省抚州市人,硕士,副教授,主要从事肿瘤病理生理方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68817865, E-mail:cqdenghy@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-08-29;**修回日期**:2005-10-20

1　材料与方法

1.1　材料与细胞株

乳腺癌细胞系：MDA-MB-435s、MDA-MB-231 由重庆医科大学外科教研室惠赠；提取 RNA 用 Trizol 试剂盒购于 PROMEGA 公司；RT-PCR 试剂盒 RNA PCR KIT(AMV)VER.3.0 购于 TaKaRa 公司；HSP90α、HSP90β 和 GAPDH 引物序列由博雅公司合成；用于 Western 杂交的兔抗人 HSP90 多克隆抗体(一抗)购于博士得公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗)购自北京中山公司；Geldanamycin(GA)购自 ALEXIS 公司；重组人工基底膜 Matrigel 购自美国 BD 公司；Transwell Chamber(8 μm 孔径)购自美国 Costar 公司；RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司；新生小牛血清购自 TED 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　人乳腺癌细胞 MDA-MB-435s、MDA-MB-231 接种于含 10% 小牛血清，pH 7.4 的 RPMI1640 培养基中，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养，至对数生长期进行实验。

1.2.2　RT-PCR　　GAPDH 引物序列：上游引物 5′- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′，下游引物 5′-GAAGATGGT GATGGGATTTC-3′；HSP90α 引物序列：上游引物 5′-AAACACCTGGAGATAAACCC-3′，下游引物 5′-GTATCATCAGCAGTAGGGTCA-3′；HSP90β 引物序列：上游引物 5′-CAAGATCAGCGAGGCCGA-3′，下游引物 5′ -CCCTTGGGACCCTGAGC-3′。GAPDH 扩增片段长度为 225 碱基对(base pair，bp)；HSP90α 扩增片段长度为 230 bp；HSP90β 扩增片段长度为 120 bp。

总 RNA 的提取按 RNA 提取试剂盒说明进行；反转录按 RT-PCR 操作试剂盒说明进行。反转录反应体系为 $MgCl_2$ 2 μl，10(RT Buffer 1 μl，Rnase Free dH_2O 3.75 μl，dNTP Mixture(各 10 mmol/L) 1 μl，Rnase Inhibitor 0.25 μl，Reverse Transcriptase 0.5 μl，Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μl，乳腺癌细胞 Total RNA (1 μg/μl) 1 μl，总反应体系为 10 μl。反转录反应条件：30 ℃ 10 min，50 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min，1 个循环。PCR 的反应体系：5 × PCR Buffer 10 μl，灭菌水 28.75 μl，TaKaRa Ex Taq^{TM}HS 0.25 μl，上游引物 0.5 μl，下游引物 0.5 μl，cDNA 10 μl，共 50 μl。HSP90α 和 HSP90β 的反应条件：95 ℃ 5 min 预变性；94 ℃ 30 s，57℃ 30 s，72 ℃ 5 min，35 个循环。取 PCR 扩增产物 5 μl 上样于 1.7% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/ml 的溴乙锭)，120 V 电压电泳 30 min，然后将凝胶放入凝胶电泳成像仪，在紫外光下自显影，经计算机扫描成像。分别测定每一个目的基因及 GAPDH 基因吸光度值(*D* 值)，取目的基因与 GAPDH 基因吸光度值的比值进行分析。

1.2.3　Western blot　　取 10^6 个乳腺癌细胞加细胞裂解液 RIPA(TritonX-100，去氧胆酸钠，NP-40，偏钒酸钠，EDTA，EGTA，1 × PBS，Aprotine 等)1 ml 和 PMSF 10 μl 裂解 30 min，4 ℃离心(2 000 r/min，30 min)后取上清。然后加入 1/5 体积的 5 × 上样缓冲液经沸水煮沸 5 min 处理后以 20 μl/道上样进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转移至 PVDF 膜，37 ℃封闭过夜，加入 1∶500 稀释的兔抗人 HSP90 多克隆抗体 37 ℃孵育 2 h，PBS 清洗 3 次，10 min/次，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 2 h，清洗 3 次后在 DAB 溶液中显色。结果用凝胶成像仪扫描，以 Quantity One4.4.0 软件分析，得到对照组与实验组 HSP 显色 *D* 值。

1.2.4　侵袭实验　　实验分两组，对照组：不加药，每天换 RPMI1640 培养液；实验组：细胞进入对数生长期后开始加药，用分别为含 16.0 nmol/L 和 27.2 nmol/L 的中效浓度 GA 培养液分别培养 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞 72 h 后用于实验，每 24 小时换液以维持药物浓度。

制备趋化因子：用含 10% 的小牛血清的 RPMI1640 液培养 NIH3T3 细胞(100ml 培养瓶)，37 ℃，5% CO_2，饱和湿度，当细胞达 80% 饱和度时用生理盐水洗 3 次，然后加无血清 RPMI1640 液 3 ml 培养 24 h 后收集上清液，离心，-20 ℃保存备用。

将 Matrigel 按 40 μl/孔均匀铺在 Transwell Chamber 膜上，成胶 30 min 后置紫外灯下照射过夜，实验前 30 min 再次成胶。

取对照组和实验组细胞各 2.0×10^5 个(RPMI1640 液 0.6 ml)分别接种到成胶的 Transwell Chamber，在 6 孔板内加入 NIH3T3 细胞上清液(趋化因子)，每孔 1.5 ml，培养 48 h 后取出 Transwell Chamber，用棉签头擦掉 Matrigel，PBS 液洗 3 次，95% 乙醇固定 15 min，HE 染色，揭下 Transwell Chamber 膜反贴在载玻片上。结果判定：400 倍光镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞数，取均值。实验重复 3 次。

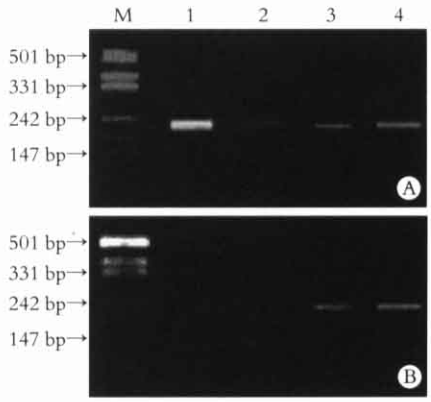
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 SAS 8.0 软件进行 *t* 检验。

2　结果

2.1　乳腺癌细胞株 HSP90mRNA 的表达情况

MDA-MB-435s(0.58 ± 0.04)细胞中 HSP90α 的 mRNA 表达水平明显高于 MDA-MB-231(0.39 ± 0.05)细胞($P < 0.01$)，MDA-MB-435s(0.41 ± 0.06)和 MDA-MB-231(0.39 ± 0.08)细胞中 HSP90β 的 mRNA 表达水平没有明显差异($P > 0.05$)，见图 1。



A：HSP90α；B：HSP90β

M：标准；1：MDA-MB-435s；2：MDA-MB-231；3：MDA-MB-435s-GAPDH；4：MDA-MB-231-GAPDH

图 1　HSP90 在乳腺癌细胞中的 mRNA 表达(RT-PCR)

2.2　乳腺癌细胞株 HSP90 蛋白质的表达情况

MDA-MB-435s(0.61 ± 0.11)细胞中 HSP90 的蛋白质表达水平明显高于 MDA-MB-231(0.28 ± 0.06)细胞($P < 0.01$)，见图 2。



1:MDA-MB-435s; 2:MDA-MB-231

图2 HSP90 在乳腺癌细胞中的蛋白表达(Western blot)

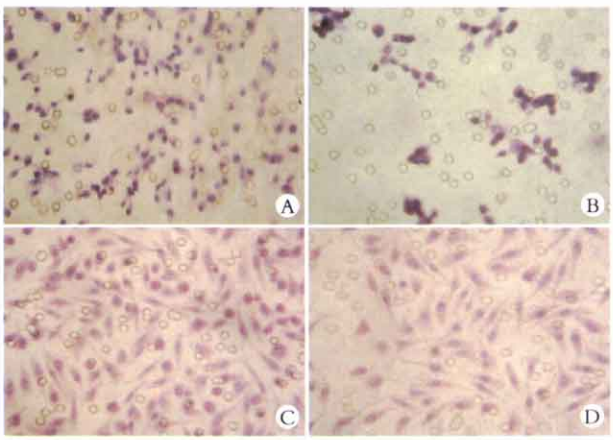
2.3 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响

GA 处理前,两株细胞的侵袭迁移能力无显著差异($P>0.05$);GA 处理后,两株细胞的侵袭迁移能力均显著下降,MDA-MB-435s 细胞下降更为明显(表1、图3)。

表1 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响

组别	侵袭细胞数	迁移细胞数
MDA-MB-435s 对照	113.2±6.4[a]	132.6±6.6[a]
MDA-MB-435s GA	41.2±9.0	57.8±9.4
MDA-MB-231 对照	120.4±12.6[b]	140.4±10.5[b]
MDA-MB-231 GA	101.0±5.2[a]	118.0±11.7[a]

a: $P<0.01$,与 MDA-MB-435s GA 组比较; b: $P<0.05$,与 MDA-MB-231 GA 组比较



A: MDA-MB-435s 细胞未处理组; B: MDA-MB-435s 细胞 GA 处理组; C: MDA-MB-23 细胞未处理组; D: MDA-MB-231 细胞 GA 处理组

图3 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响 (HE×400)

3 讨论

HSP90 是细胞内最丰富的蛋白质之一,可占细胞质内溶解蛋白质总量的1%~2%[2]。根据是否含有丰富的谷氨酰胺片段,HSP90 可分为 HSP90α 和 HSP90β 两种类型[3]。研究已经证实二者的同源性为76%[4],HSP90α 基因位于14号染色体上[5],HSP90β 基因位于6号染色体上[6]。研究表明在肿瘤细胞中 HSP90 的组成型表达比正常细胞高出2~10倍[7],许多病毒转化和化学诱导的肿瘤细胞中可明显看到 HSP90α 水平上升趋势,如胰腺癌中 HSP90α 呈选择性的高表达,细胞中存在大量的 HSP90α mRNA,而 HSP90β 却为组成型表达。

HSP90 是分子伴侣家族中一组较为独特的蛋白质,它除了作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、运输和合成过程以外,还能和一系列参与肿瘤发生发展的信号转导系统中的激酶分子和突变蛋白质相结合,并调节它们的稳定性,从而影响多种信号转导途径的作用。目前发现能与 HSP90 相结合的底物蛋白已超过100种[8]。因此,HSP90 在肿瘤研究领域已受到广泛关注。近年来 Rousseau 等[9]发现 HSP90 被抑制后可以抑制肿瘤细胞的血管生成和移动;Webb 等[10]发现 HSP90 被抑制后可抑制 HGF/SFMET 信号通路,使细胞的运动能力和侵袭能力减弱。

苯醌安莎霉素类抗生素 geldanamycin(GA)及其衍生物17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔得霉素(17-allylamio-17-desmethoxygel-danamycin,17-AAG)可以抑制 HSP90 的功能,研究证实 GA 的安莎环可以插入 HSP90 肽链的N端的 ADP/ATP 结合部位,抑制 HSP90 的弱 ATP 酶活性,妨碍其分子伴侣功能的发挥[11]。目前这类抗生素正被研发作为一种新的抗癌药物,GA 抑制 HSP90 功能的明确构效关系为探究 HSP90 的作用和作用机制提供了有力的手段。

本研究以高转移能力的乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 为实验对象,利用 RT-PCR 和 Wester-blot 技术检测了两株细胞中 HSP90 表达的差异,利用 GA 进行干预探讨 HSP90 与乳腺癌细胞侵袭转移能力的相关性。研究结果显示,两株细胞中,HSP90 的表达存在一定的差异,MDA-MB-435s 细胞中 HSP90 表达水平明显高于 MDA-MB-231 细胞,其 HSP90 水平表达增高与 HSP90α mRNA 水平增高呈一致趋势。利用 HSP90 抑制剂 GA 进行干预发现,GA 可以抑制两株细胞的侵袭转移能力,但抑制的程度并不相同,对 MDA-MB-435s 细胞的侵袭转移能力的抑制作用更加明显。这与 MDA-MB-435s 细胞中 HSP90 高表达的结果相一致。由此说明 HSP90 的表达、可能是 HSP90α 的表达与乳腺癌细胞的侵袭转移能力具有一定的相关性,在 HSP90 高表达的细胞株中,HSP90 对侵袭转移能力的调控有重要作用。

参考文献:

[1] 左文述,徐忠法,刘 奇,等. 现代乳腺肿瘤学[M]. 济南:山东科学技术出版社,1995: 13-15.

[2] LAI B T, CHIN N W, STANEK A E, *et al*. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and

polyclonal antibodies[J]. Mol Cell Biol, 1984, 4(12): 2802-2810.
[3] CSERMELY P, SCHNAIDER T, SOTI C, *et al*. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review[J]. Pharmacol Ther, 1998, 79(2): 129-168.
[4] MOORE S K, KOZAK C, ROBINSON E A, *et al*. Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins[J]. J Biol Chem, 1989, 264(10): 5343-5351.
[5] VAMVAKOPOULOS N C, GRIFFIN C A, HAWKINS A L, *et al*. Mapping the intron-containing human hsp90 alpha (HSPCAL4) gene to chromosome band 14q32[J]. Cytogenet Cell Genet, 1993, 64(3-4): 224-226.
[6] TAKAHASHI I, TANUMA R, HIRATA M, *et al*. A cosmid clone at the D6S182 locus on human chromosome 6p12 contains the 90-kDa heat shock protein beta gene (HSP90 beta)[J]. Mamm Genome, 1994, 5(2): 121-122.
[7] FERRARINE M, HELTAI S, ZOCCHI M R, *et al*. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells[J]. Int J Cancer, 1992, 51(4): 613-619.
[8] BELIAKOFF J, WHITESELL L. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2004, 15(7): 651-662.
[9] ROUSSEAU S, HOULE F, KOTANIDES H, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(14): 10661-10672.
[10] WEBB C P, HOSE C D, KOOCHEKPOUR S, *et al*. The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 342-349.
[11] WORKMAN P. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the HSP90 molecular chaperone[J]. Cancer Detect Prev, 2002, 26(6): 405-410.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2006)05-0461-01

个案与短篇

奥美拉唑与莫沙比利联合治疗中、重度反流性食管炎疗效观察

袁晓英,王 升,向明确,贾丽萍 (重庆市第九人民医院消化科,重庆 400700)

反流性食管炎是消化系统的常见病。其发病原因是食管下段括约肌(low esophageal sphincter, LES)功能失调、张力降低,使胃酸、胃蛋白酶反流入食管所致的炎性病变[1]。近年国内发病率日趋增高,患病率约为1.9%。目前药物治疗主要以抑酸剂和促动力药为主。我们选择常用的抑酸剂奥美拉唑和促动力药莫沙比利,观察其联合治疗中、重度反流性食管炎的疗效。

1 材料与方法

1.1 病例选择

选取2001年3月至2005年4月就诊病例83例,男性59例,女性24例,年龄23~69岁,平均(50.2±10.1)岁。所有患者均具有烧心、反酸、胸骨后灼痛等症状。根据我国1999年全国反流性食管病(炎)研讨会制订的标准,经内镜证实均为中、重度反流性食管炎。患者随机分为2个治疗组,两组病例的年龄、性别、病程、病情程度及主要症状等因素均衡。

1.2 治疗方法

本观察采用随机、对照、单盲的临床试验。A组(42例)为奥美拉唑肠溶片20 mg/次,早、晚餐前口服;B组(41例)奥美拉唑治疗的同时合用莫沙比利(商品名:贝络纳)5 mg/次,每日3次,饭前口服,两组均服药4周。分别于治疗前、治疗后第4周做胃镜检查。

1.3 疗效评价

1.3.1 症状观察 治疗前、后分别记录烧心、反酸、胸痛等症状。按症状的轻重分为4度。0度:无症状;1度:有感觉但不很明显;2度:症状较明显,但不影响工作;3度:症状严重,难以坚持日常工作。治疗后症状改善1度为有效,改善2度或完全消失为显效,症状无变化或加重为无效。

1.3.2 内镜观察 食道黏膜表现按胃镜下诊断标准分为4级(略)。治疗前后内镜表现改善1级为有效,改善2级为显效,无变化或加重为无效。

1.4 统计学处理

治疗前后症状和内镜的变化采用χ^2检验。

2 结果

2.1 症状改善情况

A组患者在治疗结束后总有效率为78.7%(29/42),B组患者治疗总有效率92.6%(37/41),二者相比有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 内镜观察

治疗4周后复查胃镜。A组食管炎患者在治疗结束后总有效率为71.3%(24/42),B组患者治疗后总有效率85.4%(34/41),二者相比有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

食管黏膜不具备黏膜H^+屏蔽功能,胃酸反流对食管黏膜

(下转464页)

作者简介:袁晓英(1967-),女,重庆市人,副主任医师,主要从事消化道疾病临床诊治方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68134345,E-mail:nqxiang@sina.com.cn

收稿日期:2005-09-16;修回日期:2006-01-17