论著

文章编号:1000-5404(2007)13-1320-03

格尔德霉素对乳腺癌细胞HSP、突变型p53和CDK4表达的影响

李 霞,邓华瑜 (重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨格尔德霉素(geldanamycin,GA)对乳腺癌MDA-MB-435s细胞中HSP(HSP90、HSP70、HSP27)和癌蛋白(突变型p53、CDK4)表达的影响。**方法** 采用MTT法检测GA对乳腺癌MDA-MB-435s细胞的生长抑制作用,RT-PCR检测GA作用后细胞内HSP90、HSP70、HSP27 mRNA表达变化,用Western blot检测GA作用后细胞内HSP90、HSP70、HSP27、突变型p53和CDK4蛋白质表达变化。**结果** 不同浓度GA对MDA-MB-435s细胞有生长抑制作用,呈时效量效依赖关系。400 nmol/L GA处理细胞48 h后,细胞内HSP90、HSP70、HSP27 mRNA表达和蛋白表达均增高,以HSP70增高最明显,而突变型p53和CDK4蛋白表达明显减少。**结论** GA通过下调突变型p53和CDK4表达抑制乳腺癌MDA-MB-435s细胞的增殖,同时GA可诱导细胞内HSP90、HSP70和HSP27表达参与细胞应激保护。

关键词: 格尔德霉素;乳腺癌;HSP;增殖;应激

中图法分类号: R737.9; R968; R979.14 **文献标识码:** A

Effects of geldanamycin on expression of HSP, mutant p53 and CDK4 in human breast cancer cells

LI Xia, DENG Hua-yu (Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of geldanamycin (GA) on the expression of HSP (HSP90, HSP70, HSP27) and oncoprotein (mutant p53, CDK4) in human breast cancer cell line MDA-MB-435s. **Methods** Proliferation of MDA-MB-435s cells was measured with MTT assay. The mRNA expression levels of HSP90, HSP70 and HSP27 were detected by RT-PCR. The protein expression levels of HSP90, HSP70, HSP27, mutant p53 and CDK4 were detected by Western blot. **Results** GA inhibited the proliferation of MDA-MB-435s cells in a time-dose dependent manner. The expression level of mRNA and protein of HSP90, HSP70 and HSP27 were increased, and the increasing of HSP70 was the most significant, while the protein expression level of mutant p53 and CDK4 in MDA-MB-435s cells were reduced obviously after 48-hour treatment with 400 nmol/L GA as compared with that of control cells. **Conclusion** GA inhibits the proliferation of MDA-MB-435s cells by down-regulating the level of mutant p53 and CDK4 protein, and GA involves in the protection of cell stress through increasing the expression of HSP90, HSP70 and HSP27.

Key words: geldanamycin; breast cancer; heat shock protein; proliferation; stress

HSP90作为分子伴侣,在应激耐受、蛋白折叠和保持蛋白稳定与活化的翻译后调控中起重要作用。近年研究表明,一些小分子天然产物以较高的亲和力与HSP90结合并选择性地破坏其分子伴侣功能,格尔德霉素(geldanamycin,GA)就是其中一种。GA可结合到HSP90N末端ATP/ADP结构域,特异地抑制HSP90与多种肿瘤相关蛋白的相互作用,降低蛋白稳定性,促进其降解,从而抑制肿瘤细胞生长信号通路,这些蛋白在肿瘤细胞中主要是依赖HSP90的分子伴侣作用而保持其稳定与活性的。GA作为一种基于肿瘤细胞和正常细胞对HSP90不同依赖性的特性而开发的抗癌新药研究已受到广泛重视[1]。GA除了对肿瘤细胞生长信号通路有抑制作用外,还可能诱导细胞内的热休克反应(HSR)[2],值得注意。本研究通过观察GA对乳腺癌MDA-MB-435s细胞增殖的影响,相应检测细胞内HSP90、HSP70、HSP27在mRNA水平和蛋白质水平的表达变化以及突变型p53、CDK4蛋白表达变化,探讨其相互关系和意义,为GA应用于乳腺癌治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GA为Alexis公司产品,用DMSO(<0.01%)溶解后用RPMI1640培养液配成1 mmol/L的储存液,保存于-20 ℃。四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)为Sigma公司产品。总RNA

基金项目: 重庆科技计划项目(2005AC0075)
Supported by the Sci & Tech Project of Chongqing(2005AC0075)

作者简介: 李 霞(1975-),女,四川省名山县人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理生理方面的研究。电话:(0871)6966032

通讯作者: 邓华瑜,电话:(023)68817865,E-mail:cqdenghy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-04-26;**修回日期:** 2006-11-10

提取试剂盒购自 Promega 公司,逆转录 PCR 反应试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,RT-PCR 引物由上海博亚试剂公司合成。抗 HSP90 多抗、抗 HSP70 单抗、抗 HSP27 多抗和 β-actin 购自武汉博士德公司,抗 p53 单抗、抗 CDK4 多抗和辣根过氧化物酶标记的二抗购自中山生物技术公司。人乳腺癌细胞株 MDA-MB- 435s 由本教研室提供。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与实验分组　　细胞培养:将人乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞长到 80% 时传代,3 ~4 d 传代 1 次。实验分组:未处理组(对照组):用 RPMI1640 培养液培养。GA 处理组(实验组):细胞接种 24 h 开始加药,药物作用 48 h 用于实验。

1.2.2　MTT 法测定细胞增殖　　收集对数生长期细胞,调整密度以 1×10^4/孔接种于 96 孔培养板,培养 24 h,实验组加入 1 mmol/L GA 储存液使其终浓度为 100、200、400、800 nmol/L,以等量 DMSO 作为试剂对照,每组设 4 个复孔。分别培养 24、48 h 和 72 h 后每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,再培养 4 h,弃去上清液,每孔加入 150 μl DMSO 溶解沉淀,微型振荡仪振荡 10 min 混匀,用酶标仪测定波长 570 nm 的吸光度值[D(570)],细胞生长抑制率 = [1 - 实验组平均 D(570)/对照组平均 D(570)] ×100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3　RT-PCR 分析 GA 作用后 HSP90、HSP70、HSP27 mRNA 的表达变化　　实验组细胞经 400 nmol/L GA 处理 48 h。提取细胞总 RNA,取 2 μl RNA 进行逆转录得 cDNA。HSP90 正向引物序列为:5′-AAACACCTGGAGATAAACCC-3′,反向引物序列为:5′-GTATCATCAGCAGTAGGGTCA-3′,合成 DNA 片段为 230 bp;HSP70 正向引物序列为:5′-TACCCACTGGAAGGACTTAG-3′,反向引物序列为 5′-TGTAGGCAACTGCACAATAT-3′,合成 DNA 片段为 444 bp;HSP27 正向引物序列为:5′-CAAGGATGGCGTGGTGGAGA-3′,反向引物序列为:5′-CGAAGGTGACTGGGATGGTGA-3′,合成 DNA 片段为 218 bp;人 GAPDH 正向引物序列为:5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,反向引物为:5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′,合成 DNA 片段序列为 225 bp。94 ℃预变性 2 min 后,94 ℃ 30 s、57 ℃ 30 s、72 ℃ 5 min,循环 35 次后,72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后凝胶成像。用 Quantity One 4.4.0 软件分析,数值以目的条带灰度与 GAPDH 条带灰度的比值表示。

1.2.4　Western blot 检测 GA 作用后 HSP90、HSP70、HSP27、突变型 p53 和 CDK4 蛋白的表达变化　　实验组细胞经 400 nmol/L GA 处理 48 h。细胞用冰 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液,冰上静置 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清用 Braford 法测定蛋白质浓度。电泳前加 2 ×SDS 缓冲液调整蛋白浓度至 2 mg/ml,100 ℃水浴 5 min,离心后取 40 μg 蛋白/泳道进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,开始电压 60 V,待蛋白质进入分离胶后将电压增至 120 V。蛋白分离后,30 V 恒压电转至硝酸纤维素膜上。室温封闭 2 h,一抗室温反应 2 h,二抗室温反应 2 h,DAB 显色。结果用凝胶成像仪扫描,用 Quantity One 4.4.0 软件分析,数值以目的蛋白条带灰度与 β-actin 蛋白条带灰度的比值表示。

1.3　统计学处理

采用 SAS 8.0 统计学软件进行 t 检验、方差分析和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　GA 对 MDA-MB-435s 细胞生长的抑制作用

GA 可抑制 MDA-MB-435s 细胞的生长,抑制作用呈时效量效关系。100、200、400、800 nmol/L GA 分别处理 MDA-MB-435s 细胞 24、48、72 h,与对照组相比,GA 作用后细胞生长抑制率均不同程度地增高,呈时效量效依赖关系。不同浓度和不同作用时间之间的抑制率差异均有显著性($P<0.05$)(图 1)。

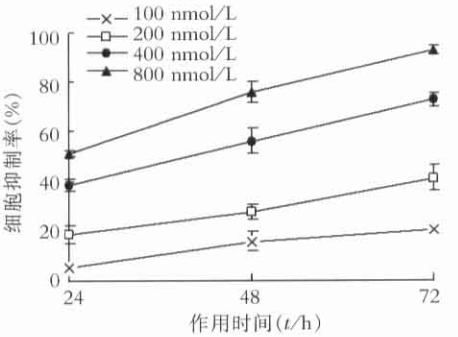


图 1　GA 对 MDA-MB-435s 细胞的生长抑制作用

2.2　GA 对 MDA-MB-435s 细胞中 HSP27、HSP70、HSP90 mRNA 表达的影响

GA 作用后 MDA-MB-435s 细胞中 HSP90、HSP70 和 HSP27 mRNA 表达增高。RT-PCR 结果显示:400 nmol/L GA 作用 48 h 后,乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞中 HSP90、HSP70 和 HSP27 mRNA 表达增高,分别为对照组的 1.33、2.21 倍和 1.17 倍,以 HSP70 增高最明显,光密度值有显著性差异($P<0.05$)(表 1)。

表 1　GA 对 MDA-MB-435s 细胞中 HSP27、HSP70、HSP90 mRNA 表达的影响 [D(570), $n=3$, $\bar{x}\pm s$]

组别	HSP27	HSP70	HSP90
对照组	0.64 ±0.04	0.33 ±0.05	0.52 ±0.04
GA 处理组	0.86 ±0.06[a]	0.74 ±0.03[a]	0.61 ±0.05[a]

a: $P<0.05$, 与对照组比较

2.3　GA 对 MDA-MB-435s 细胞中 HSP27、HSP70、HSP90 突变型 p53 和 CDK4 蛋白表达的影响

GA 作用后 MDA-MB-435s 细胞中 HSP90、HSP70 和 HSP27 蛋白表达增高,而突变型 p53 和 CDK4 蛋白表达下降。Western blot 结果显示:400 nmol/L GA 作用 48 h 后,乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞中 HSP90、HSP70 和 HSP27 蛋白表达增高,分别为对照组的 1.67、2.1 倍和 1.2 倍,其中 HSP770 增高最显著。而突变型 p53 和 CDK4 蛋白表达明显下降,分别减少 65% 和 52%。吸光度值有显著性差异($P<0.05$)(表 2)。

表 2　GA 对 MDA-MB-435s 细胞中 HSP27、HSP70、HSP90 突变型 p53 和 CDK4 蛋白表达的影响 [D(570), $n=3$, $\bar{x}\pm s$]

组别	HSP27	HSP70	HSP90	突变型 p53	CDK4
对照组	0.46 ±0.03	0.41 ±0.04	0.37 ±0.06	0.73 ±0.05	0.38 ±0.04
GA 处理组	0.77 ±0.05[a]	0.86 ±0.06[a]	0.45 ±0.05[a]	0.35 ±0.03[a]	0.16 ±0.07[a]

a: $P<0.05$, 与对照组比较

3 讨论

HSP90是真核细胞中广泛存在的一种分子伴侣蛋白,在肿瘤细胞中的表达较正常细胞高出2~10倍,HSP90的效应蛋白是肿瘤细胞生长转移信号通路中起重要作用的蛋白激酶和转录因子,它们对肿瘤细胞生长转移的血液供应、营养支持、信号刺激和物质代谢起重要作用。HSP90通过其分子伴侣作用与其效应蛋白结合,稳定蛋白构象,使其以活性形式存在,防止其降解,从而维持肿瘤细胞的生长优势。格尔德霉素(GA)属于苯醌安莎霉素类抗生素,是最先被发现的HSP90抑制剂,早期研究认为GA的抗癌活性是因其抑制蛋白激酶的活性所致,然而近年来明确它们是通过抑制HSP90的分子伴侣功能来发挥抗肿瘤作用[3]。GA可与ATP竞争结合HSP90 N末端的ATP/ADP结合位点,改变HSP90构象,使其不能与效应蛋白及其他小分子蛋白(如HSP70、Hop、HSP40、p23)形成复合体,抑制其正常的分子伴侣功能,最终导致效应蛋白降解,阻断肿瘤细胞赖以生存的信号通路,抑制细胞生长。

本实验显示,GA作用后可抑制乳腺癌MDA-MB-435s细胞增殖,这种抑制作用呈时效量效依赖关系。400 nmol/LGA作用细胞48 h后,细胞内突变型p53和CDK4表达明显下降,表明GA作用后细胞增殖抑制与突变型p53和CDK4表达减少有关。突变型p53和CDK4是细胞周期的重要调控因子,可能是HSP90的效应蛋白,通过与HSP90结合,稳定其结构,使其在肿瘤细胞中持续高表达,以维持肿瘤细胞的生长优势。GA作用后可抑制HSP90与它们的相互作用,导致其在蛋白酶作用下降解,表达下降,从而抑制细胞增殖。

我们实验还发现,GA可诱导HSP90、HSP70和HSP27表达增高。HSP的表达主要受热休克因子(heat shock factor, HSF)的调控,HSF1是最重要的调控因子。有报道,HSP90可与HSF1形成复合物,以维持HSF1的转录失活状态[4]。GA可以抑制HSP90与HSF1的相互作用,使HSF1释放出来,激活HSF1从而诱导HSP72的合成,也可通过Ca^{2+}和PKC介导的信号转导通路诱导HSP70-1/2的表达[5,6]。GA可破坏HSP90与HSF1之间的结合作用,以一种非蛋白毒性方式诱导热休克反应[7]。本研究可见,GA作用乳腺癌MDA-MB-435s细胞后,可诱导HSP90、HSP70和HSP27的表达,在mRNA水平和蛋白质水平表达都增高,其中HSP70增高最明显。HSP是一类应激蛋白,在细胞受应激原刺激时表达增高,此为细胞保护的应激反应,GA亦为一种应激原[8,9]。GA作用后细胞内HSP表达的增高,可能增强肿瘤细胞生存能力,对肿瘤细胞起保护作用,这应当是GA应用于临床试验值得考虑的因素。

GA诱导HSP表达增高,但GA对乳腺癌MDA-MB-435s细胞生长的作用显示以抑制为主,并随着GA浓度的增高和作用时间的延长,细胞生长的抑制率逐渐增高,表明GA作用主要通过抑制HSP90的分子伴侣功能而形成最终效应。GA抑制HSP90功能可同时靶向多种蛋白,使HSP90效应蛋白如突变型p53、CDK4等表达下降,破坏肿瘤细胞赖以生存的信号通路网络,此为GA细胞增殖抑制作用的重要基础。在GA及其衍生物17-AGG的临床试验中,如何对待药物诱导HSP表达可能产生的细胞应激保护作用[10],有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Park J W, Yeh M W, Wong M G, *et al*. The heat shock protein 90-binding geldanamycin inhibits cancer cell proliferation, down-regulates oncoproteins, and inhibits epidermal growth factor-induced invasion in thyroid cancer cell lines[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(7): 3346-3353.

[2] Lawson B, Brewer J W, Hendershot L M. Geldanamycin, an hsp90/GRP94-binding drug, induces increased transcription of endoplasmic reticulum (ER) chaperones via the ER stress pathway[J]. J Cell Physiol, 1998, 174(2): 170-178.

[3] Kaelin W G, Jr. Taking aim at novel molecular targets in cancer therapy[J]. J Clin Invest, 1999, 104(11): 1495.

[4] Nair S C, Toran E J, Rimerman R A, *et al*. A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor[J]. Cell Stress Chaperones, 1996, 1(4): 237-250.

[5] Knowlton A A, Sun L. Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(1): H455-H464.

[6] Shu C W, Cheng N L, Chang W M, *et al*. Transactivation of hsp70-1/2 in geldanamycin-treated human non-small cell lung cancer H460 cells: involvement of intracellular calcium and protein kinase C[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(6): 1199-1209.

[7] Zou J, Guo Y, Guettouche T, *et al*. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1[J]. Cell, 1998, 94(4): 471-480.

[8] Mimnaugh E G, Xu W, Vos M, *et al*. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(5): 551-566.

[9] 邓华瑜,罗红霞,范维珂. HSP90表达对乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 458-461.

[10] Bagatell R, Paine-Murrieta G D, Taylor C W, *et al*. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(8): 3312-3318.

(编辑 薛国文)