文章编号:1000-5404(2008)17-1601-03

论著

赫赛汀和 9-顺式视黄酸联合用药对 HER2 阳性荷瘤鼠乳腺癌细胞的抑制效应

郎海滨,糜漫天,朱俊东 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨赫赛汀和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 HER2 阳性乳腺癌细胞周期进程的体内协同抑制效应及其分子机制。方法 将处于对数生长期的 MCF-7^{HER2} 细胞皮下注射到 BALB/c 裸鼠体内,用赫赛汀和 9-顺式视黄酸分别单独和联合处理裸鼠移植瘤模型 20d,测量各组裸鼠移植瘤的体积大小。利用免疫印记法检测移植瘤细胞 HER2、P27、Cyclin E 和 CDK2 蛋白的表达变化。结果 赫赛汀和 9-顺式视黄酸联合作用组较对照和单独作用组能显著减小 HER2 阳性乳腺癌细胞裸鼠移植瘤的体积,二者联合运用还能在体内显著改变荷瘤鼠癌细胞 HER2、P27、Cyclin E 和 CDK2 的表达。结论 联合应用赫赛汀和 9-顺式视黄酸可在体内通过对细胞周期相关蛋白的表达进行调控从而达到协同抑制 HER2 阳性乳腺癌细胞的作用。

关键词:赫赛汀;9-顺式视黄酸;乳腺癌;HER2
中图法分类号:R737.9;R977.21;R979.19 文献标识码:A

Synergistic effects of trastuzumab and 9-cis-RA on HER2/neu positive breast cancer cells implanted to nude mice

LANG Hai-bin, MI Man-tian, ZHU Jun-dong (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the synergistic effects of trastuzumab and 9-cis-RA on HER2/neu positive breast cancer cells *in vivo*. Methods MCF-7 breast cancer cells transfected with exogenous HER2 gene were inoculated into nude mice. Four weeks later, the mice bearing a tumor of approximately 200 mm^3 in volume were selected to be treated with trastuzumab and/or 9-cis-RA (SC) for 20 d. Then the tumor volume was precisely measured, simultaneously the protein expressions of Cyclin E, CDK2 as well as P27 in the tumor tissues were detected by Western blot assay. Results The combination of trastuzumab and 9-cis-RA synergistically decreased the tumor volume, compared with control group and single medication group. Western blot results showed that the Cyclin E and CDK2 expressions were significantly inhibited, while P27 protein expressions were remarkably up-regulated by the co-treatment. Conclusion Trastuzumab and 9-cis-RA could synergistically inhibit the proliferation of HER2 positive breast cancer cells *in vivo* by influencing the protein expressions of G_0/G_1 phase-related molecules.

Key words: trastuzumab; 9-cis-RA; breast cancer; HER2

乳腺癌中 HER2/neu 阳性乳腺癌以肿瘤恶性程度高,预后差,易复发,死亡率高而最受关注。20% ~ 25% 的乳腺癌患者存在 HER2/neu 基因过表达的情况,而目前已公认 HER2/neu 的过表达与乳腺癌的发生存在着密切联系,并可作为检测乳腺癌预后情况及长期生存率的独立指标[1]。曲妥珠单抗[trastuzumab,商品名赫赛汀(herceptin)]作为针对癌细胞 HER2/neu 基因靶点的第一个分子靶向药物,为乳腺癌尤其是 HER2/neu 阳性乳腺癌的临床治疗带来了新的突破。但临床研究发现一定剂量的赫赛汀单独作用可导致心力衰竭等毒副作用[2],因此,目前多主张利用较低剂量的赫赛汀联合其他抗肿瘤药物共同发挥抑制 HER2/neu 阳性乳腺癌的作用。9-顺式视黄酸是视黄酸 X 类受体 RXR 的选择性配体,属于维生素 A 的重要衍生物,已有研究证实 9-顺式视黄酸可有效抑制乳腺癌细胞增殖[3]。本研究拟以转染了 HER2/neu 质粒的 MCF-7 乳腺癌细胞裸鼠移植瘤为研究对象,观察赫赛汀和 9-顺式视黄酸联合用药对移植瘤的影响及其机制。

基金项目:国家自然科学基金(30300285)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300285)
作者简介:郎海滨,男,山西省太原市人,博士,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68753361, E-mail:cqlang@163.com
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2007-12-10;修回日期:2008-04-15

1 材料与方法

1.1 细胞株

MCF-7 乳腺癌细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 实验动物

选用 3～4 周龄健康雌性免疫缺陷 BALB/c 裸鼠 20 只，SPF 级，体质量（10±2）g，由第三军医大学实验动物中心提供，喂养于严格消毒无菌层流动物房内，环境温度维持在 25 ℃，饲料和水经消毒处理后自由进食。

1.3 质粒

含人 erbB-2/neu 基因的质粒（pCMV/ErBb2）由美国 Anderson 癌症研究中心的 Ming Tan 教授惠赠；含新霉素抗性基因的空载体质粒（pCIneo）由本室保存。

1.4 主要试剂

DMEM/F12 培养基购自 HyClone 公司；新生胎牛血清购自天津 TBD 公司；赫赛汀购自美国 Genentech 公司；9-顺式视黄酸购自美国 Sigma 公司；抗 HER2、Cyclin E、CDK2 小鼠单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；S-P 二抗试剂盒和小鼠 IgG 购自中杉公司。

1.5 质粒转染

利用脂质体转染法将 pCMV/ErBb2 质粒和带有新霉素抗性基因的 pCIneo 质粒共转染到 MCF-7 细胞内，然后以 400 μg/ml 的 G418 初筛转染的 MCF-7 细胞，待对照组细胞完全死亡后，再以 200 μg/ml G418 维持筛选 2 周，最后得到 MCF-7^{HER2} 细胞。

1.6 裸鼠移植瘤模型建立和分组

取对数生长期的 MCF-7^{HER2} 细胞，0.25% 胰酶消化后，无菌 PBS 漂洗细胞 2 遍，离心，用无血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞，调整细胞数为 $1\times10^7\cdot ml^{-1}$，每只 BALB/c 裸鼠用 1 ml 注射器接种 200 μl 细胞悬液于其背部右侧皮下。细胞接种 7 d 后，所有裸鼠背部均长出异种移植瘤，成瘤率为 100%。待细胞接种 4 周后，测量肿瘤的最大直径 L（cm）和最小直径 D（cm），按下述公式测量移植瘤体积，平均体积为 1.29 cm^3。将荷瘤裸鼠随机分为 5 组（4 只/组）：对照组，抗体对照组，9-顺式视黄酸处理组，赫赛汀处理组，联合处理组，各组移植瘤体积无显著差异。

$$肿瘤体积(cm^3)=\frac{1}{2}\times L^2\times D$$

1.7 药物处理

药物处理剂量：9-顺式视黄酸：1.5 μg/kg；赫赛汀为 10 mg/kg；对照抗体为 10 mg/kg。于移植瘤周边皮下注射给药，隔日 1 次，共给药 10 次，待药物处理 20 d 后，引颈处死动物。测量肿瘤的最大直径和最小直径，计算各组肿瘤体积的大小，进行差异分析，同时利用金氏公式 $q=\frac{Ea+b}{Ea+Eb-Ea\times Eb}$ 计算出相应的 q 值以确定二者联合用药是否具有体内协同抑制效应。

1.8 HER-2、P27、Cyclin E、CDK2 表达的检测

将药物作用 20 d 后的 BALA/c 裸鼠活杀，剥离瘤体，用冰预冷的 0.9% 生理盐水冲洗干净，放入 5 ml 离心管中，立即加入 1 ml 预冷至 0℃的裂解液，冰浴中匀浆，4 ℃ 12 000×g 离心 10 min。将上清液转移至另一离心管中。参照 Lowry 法检测样本蛋白浓度，－20℃保存备用。取含 70 μg 蛋白的裂解液与上样缓冲液混合，加入 β-巯基乙醇，沸水浴中放置 5 min，行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后，将 PAGE 胶上的蛋白用湿式转印法转至 PVDF 膜上，用 1% BSA/TBS 封闭 PVDF 膜，4 ℃过夜，然后依次加入按一定比例稀释的一抗、二抗以及卵白素，最后用 DAB 显色，扫描并保存结果。

1.9 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

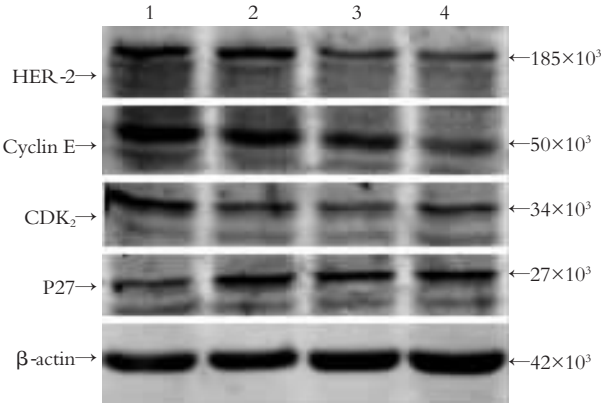
2 结果

2.1 MCF-7^{HER2} 细胞裸鼠移植瘤体积的变化

经 1.5 μg/kg 的 9-顺式视黄酸和 10 mg/kg 的赫赛汀联合处理 20 d 的裸鼠移植瘤的体积为（0.43±0.09）cm^3，不仅显著低于对照组（2.02±0.23）cm^3、抗体对照组（1.96±0.25）cm^3 和单纯给药组（$P<0.05$），较给药前移植瘤体积也显著减小。利用金氏公式计算出 q 值为 1.37，提示二者联合用药可在体内有效协同抑制 HER2 阳性乳腺肿瘤。

2.2 MCF-7^{HER2} 细胞裸鼠移植瘤 CDK2、Cyclin E 和 p27 蛋白表达的变化

Western blot 检测结果显示，经赫赛汀和 9-顺式视黄酸联合处理 20 d 后，移植瘤细胞 HER2 的表达较对照组明显降低（$P<0.05$），而转染空载体 MCF-7 细胞裸鼠移植瘤其 HER2 的表达呈阴性（照片未单独列出），与此同时，CDK2 和 Cyclin E 的表达也较对照组显著下降（$P<0.05$），P27 的蛋白表达则较对照组显著上升（$P<0.05$，图 1）。



1 抗体对照组；2 9-顺式视黄酸处理组；3 赫赛汀处理组；4 联合处理组

图 1 MCF-7^{HER2} 裸鼠移植瘤细胞 HER-2、P27、CDK2、Cyclin E 蛋白的表达

3 讨论

HER2/neu 是一个相对分子质量约 185×10^3 的跨膜受体[4]，是表皮生长因子受体家族的一员，其表达和活性与肿瘤的发生、发展和预后密切相关。赫赛汀可特异性地识别癌细胞 HER2/neu 胞外域的抗原决定簇，是首个被用于治疗 HER2/neu 阳性乳腺癌的分子靶向药物。Kono 等[5]的研究表明，Herceptin 能够促进 HER2/neu 内吞和降解，从而增加 HER2/neu 衍生片段，这些被降解的蛋白肽链可以被 MHC Ⅰ 类分子提

呈，激活肿瘤特异性 CTL 细胞，导致肿瘤细胞溶解。目前已有研究证实赫赛汀不但在单独用药时对 HER2/neu 阳性乳腺癌具有良好的治疗效果，还可与多种化疗药物和基因疗法联合作用治疗 HER2/neu 阳性乳腺癌[6-9]，均具有协同抑制效应而几乎不增加毒性，赫赛汀与其他药物联合对 HER2/neu 阳性乳腺癌的协同效应作为研究的热点正受到越来越多的关注。

9-顺式视黄酸属于维生素 A 类衍生物，能够选择性的结合并激活视黄酸 X 类受体的各种亚型（RXRα、RXRβ、RXRγ）。RXR 一方面可与诸如 RARα、PPARγ、VDR 以及甲状腺受体家族成员等形成异源二聚体，另一方面也可以与 RXR 形成同源二聚体进而对下游基因的表达进行调控，控制细胞的分化和增殖。有研究发现 RXR 选择性配体能够显著抑制 HER2/neu 转基因小鼠乳腺肿瘤的生成，同时其毒副作用与传统的视黄酸相比也有明显的降低，提示作为 RXR 选择性配体的 9-顺式视黄酸可能对那些高表达 HER2/neu 基因且对全反式视黄酸耐药的乳腺肿瘤具有潜在的疗效[10]。

细胞周期素依赖性激酶 2（CDK2）是最重要的细胞周期蛋白之一，它通过与 Cyclin E 等细胞周期素蛋白相互作用而影响细胞周期 G_0/G_1 期时相转换、G_1 早期、G_1/S 期、DNA 合成与有丝分裂期，任何抑制 CDK2 活性的因素均能抑制肿瘤细胞的恶性增生。与此同时，作为细胞周期素及其依赖性激酶的负调控因子，p27 可与 CDK2/Cyclin E 复合体发生结合从而抑制其激酶活性并最终导致细胞周期进程的阻遏。研究发现，HER2/neu 与 p27 的表达水平之间呈显著负相关[11]，p27 的表达水平则是评价 HER2/neu 阳性乳腺癌患者预后情况的较有价值的指标之一[12]。在包括 HER2 阳性乳腺癌细胞在内的许多增殖能力旺盛的肿瘤细胞中不同程度地存在着 p27 低表达的情况，而 p27、Cyclin E 和 CDK2 又是包括赫赛汀在内的许多抗肿瘤药物的靶作用点。研究显示，赫赛汀主要是通过阻断 PI3K/Akt 信号路径来削弱其对 p27 的抑制作用，而 Le 等[13]利用 RNA 干扰技术将 ErbB2 阳性乳腺癌细胞中 p27 的表达封闭后发现赫赛汀的细胞增殖抑制能力受到明显削弱，G_0/G_1 期细胞的比例显著降低。提示，p27 是赫赛汀发挥抗肿瘤作用的必要条件之一。

有鉴于此，本研究首先建立了转染外源性 HER2 基因的 MCF-7 乳腺癌细胞 BALB/c 裸鼠移植瘤模型，在此基础上利用 HER2/neu 特异性抗体赫赛汀和 RXR 配体 9-顺式视黄酸联合处理该移植瘤模型 20 d，与单独处理组和对照组相比，联合处理组移植瘤的体积显著缩小。同时，联合处理组移植瘤细胞 HER2、Cyclin E 以及 CDK2 蛋白的表达较对照组均显著下降，而 P27 蛋白表达则显著上升。上述结果提示赫赛汀和 9-顺式视黄酸联合用药能够通过调控细胞周期相关蛋白的表达来达到在体内抑制 HER2/neu 阳性乳腺癌的目的。

参考文献：

[1] Slamon D J, Godolphin W, Jones L A, *et al*. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer[J]. Science, 1989, 244(4905): 707-712.

[2] Smith K L, Dang C, Seidman A D. Cardiac dysfunction associated with trastuzumab[J]. Expert Opin Drug Saf, 2006, 5(5): 619-629.

[3] Paik J, Blaner W S, Swisshelm K. Cis-retinol dehydrogenase: 9-cis-retinol metabolism and its effect on proliferation of human MCF7 breast cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2005, 303(1): 183-196.

[4] Schechter A L, Stern D F, Vaidyanathan L, *et al*. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen[J]. Nature, 1984, 312(5994): 513-516.

[5] Kono K, Sato E, Naganuma H, *et al*. Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(7): 2538-2544.

[6] Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto N J, *et al*. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(10): 2162-2171.

[7] Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, *et al*. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(19): 4265-4274.

[8] Untch M, Kahlert S, Petruzelka L, *et al*. A multinational phase II study of Navelbine (N) and Herceptin (H) as first-line therapy for patients with HER2-positive metastatic breast cancer (HER2 + MBC)[J]. EJC Supplements, 2004, 2(3): 127.

[9] McKenzie T, Liu Y, Fanale M, *et al*. Combination therapy of Admda7 and trastuzumab increases cell death in HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells[J]. Surgery, 2004, 136(2): 437-442.

[10] Wu K, Zhang Y, Xu X C, *et al*. The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, prevents the development of estrogen receptor-negative mammary tumors in transgenic mice[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6376-6380.

[11] Borgquist S, Anagnostaki L, Jirstrom K, *et al*. Breast tumours following combined hormone replacement therapy express favourable prognostic factors[J]. Int J Cancer, 2007, 120(10): 2202-2207.

[12] Traub F, Menqel M, Luck H J, *et al*. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(2): 185-191.

[13] Le X F, Claret F X, Lammayot A, *et al*. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition[J]. J Biol Chem, 2003, 278(26): 23441-23450.

（编辑　吴培红）