论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0908-04

非基因组活性对雌激素受体阳性乳腺癌细胞 Herceptin 敏感性的影响

姜晓梅[1],陈 彬[1],韩 谊[2],王 越[1],王 杨[1],李渝萍[1],娄桂予[1],张 艳[1],何凤田[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1];学员旅十二队[2])

【摘要】 **目的** 探讨雌激素(estrogen,E2)通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)非基因组活性干扰 ER 阳性(ER^+)乳腺癌细胞对人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)的人源化单克隆抗体赫赛汀(Herceptin)的敏感性及其机制。**方法** 采用 Western blot 和瞬时转染结合荧光素酶报告基因分析,确定 BT-474 乳腺癌细胞(ER^+/$HER2^+$)和 SKBR-3 乳腺癌细胞(ER^-/$HER2^+$)作为对比研究对象;在 E2 存在与否的情况下,采用细胞增殖分析比较 Heregulin(HRG)诱导的 BT-474 和 SKBR-3 细胞对 Herceptin 敏感性的改变;采用 Western blot 检测 HER2 途径下游关键分子 MAPK 的磷酸化水平。**结果** 在没有 E2 存在的情况下,Herceptin 可有效抑制 BT-474 和 SKBR-3 细胞的增殖($P<0.01$);在 E2 存在的情况下,Herceptin 对 BT-474 细胞增殖的抑制效应消失($P>0.01$),同时,Herceptin 不能降低 MAPK 的磷酸化;这些现象在 SKBR-3 乳腺癌细胞中却不会出现。**结论** E2 可通过 ER 非基因组活性影响 ER^+的乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果,并可能参与了 Herceptin 抵抗的发生。

【关键词】 Herceptin;乳腺癌;抵抗;ER;非基因组活性

【中图法分类号】 R737.9;R73-362;R977.12 【文献标志码】 A

Estrogen receptor improves sensitivity of Herceptin in ER positive breast cancer cells through its non-genomic activity

Jiang Xiaomei[1], Chen Bin[1], Han Yi[2], Wang Yue[1], Wang Yang[1], Li Yuping[1], Lou Guiyu[1], Zhang Yan[1], He Fengtian[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, [2]12th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of estrogen (E2) on the sensitivity of Herceptin, a humanized monoclonal antibody directed against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), in ER positive breast cancer cell line and investigate the underlying mechanism of this effect whether through estrogen receptor (ER) non-genomic activity. **Methods** ER-positive/HER2-positive breast cancer BT-474 cells and ER-negative/HER2-positive SKBR-3 cells was identified by Western blotting and instantaneous carrying combined with fluorescent element enzymes. In the presence or absence of estrogen, the sensitivity of the cells to Herceptin on inhibiting Hereguilin-induced cell proliferation was detected by cell proliferation assay and the effect of Herceptin on the levels of phosphorylation of MAPK and the downstream key molecules of HER2 pathway was observed by Western blotting. **Results** In absence of estrogen, Herceptin effectively inhibited Hereguilin-induced proliferation of BT-474 and SKBR-3 cells ($P<0.01$). In presence of estrogen, the inhibitory effect of herceptin on Hereguilin-induced BT-474 cell proliferation was disappeared ($P>0.01$) and Herceptin could not inhibit Hereguilin-induced phosphorylation of MAPK. These changes were not observed in SKBR-3 cells. **Conclusion** E2 can affect the efficiency of Herceptin on ER positive breast cancer cells through the ER non-genomic activity, which may be involved in the generation of Herceptin resistance.

【**Key words**】 Herceptin; breast cancer; resistance; estrogen recepoter, non-genomic activity

Surported by the National Natural Science Foundation of China (30972933), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009AC5173) and the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University (2009). Corresponding author: Chen Bin, Tel: 86-23-68752944, E-mail: binnchen@tom.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30972933);重庆市自然科学基金(CSTC2009AC5173);第三军医大学归国人员启动基金(2009)

【通信作者】 陈 彬,电话:(023)68752944,E-mail:binnchen@tom.com

乳腺癌是一种最常见的、严重威胁妇女身心健康的恶性肿瘤，占妇女全身恶性肿瘤的7% ~10%，其临床表现和对治疗干预的反应性依赖于多基因改变[1-2]。雌激素受体(erstrogen receptor，ER)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2，EGFR/HER2)途径是乳腺癌细胞存活、增殖、发育和分化等生理活动所依赖的主要信号途径[3]。最近的研究显示，位于细胞膜或细胞质的ER可介导快速的非基因组活性(ER non-genomic activity)[4-5]，ER可通过该活性和HER2途径之间进行广泛的“串话(cross-talk)”或相互作用[6]。已有报道在HER2$^+$或过表达的乳腺癌细胞(如BT-474细胞)中，ER的非基因组活性表现更活跃，并与内分泌治疗抵抗相关[7-8]。Herceptin(中文商品名“赫赛汀”)是针对HER2的人源化单克隆抗体，是目前临床用于转移性乳腺癌的HER2靶向治疗药物[9-10]。但临床Herceptin治疗抵抗十分常见，其机制尚不完全清楚[11-13]。由于作为Herceptin治疗靶点的HER2受体途径，可被位于细胞膜或细胞质的ER通过非基因组活性激活，势必增加Herceptin的有效抑制剂量，从而减弱Herceptin的治疗效果，故我们推测ER的非基因组活性可能参与了ER$^+$乳腺癌细胞Herceptin治疗抵抗的产生。本研究选择ER$^+$和HER2$^+$的BT-474和ER$^-$和HER2$^+$的SKBR-3乳腺癌细胞作为对比研究对象，观察雌激素(estrogen，E2)及ER的非基因组活性对ER$^+$的乳腺癌细胞Herceptin治疗敏感性的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 乳腺癌细胞系BT-474和SKBR-3购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养液和无酚红DMEM培养基，10%热灭活胎牛血清和经木炭葡聚糖(Charcoal-1 dextran)处理的胎牛血清购自HyClone公司，Herceptin(本实验中表示为HPT)购自Roche公司，E2、ER拮抗剂ICI 182,780(简写为ICI)和Hereguilin(HGR)购自Sigma公司，各种抗体包括ER和HER2抗体、MAPK及其磷酸化抗体、β-actin抗体、HRP-IgG抗体均购自Cell Signal公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 人乳腺癌细胞株BT-474，SKBR-3，常规培养于含4.0 mmol/L谷氨酰胺，4 500 mg/L葡萄糖，10%热灭活胎牛血清，1%青/链霉素，1 mmol/L丙酮酸钠的DMEM培养液中。激素、细胞因子或抑制剂处理细胞前，细胞经去内源性激素的上述DMEM培养基(10% CD-FBS/DMEM)继续培养72 h，然后用10 nmol/L HRG，10 nmol/L E2，1.0 μmol/L HPT、10 nmol/L ICI分别处理细胞，实验细胞分为5组：DMSO处理组(对照组)，HRG处理组，HRG + HPT处理组、E2 + HRG处理组和E2 + HRG + HPT处理组。

1.2.2 细胞增殖分析 根据CellTiter 96 AQueous增殖实验说明书，BT-474细胞和SKBR-3细胞在无酚红，去除类固醇激素的DMEM培养基中培养72 h后分别接种于96孔板，每孔终体积200 μl，每孔约10^5个细胞，各组细胞分别用DMSO和不同终浓度的HRG、HPT、E2 + HRG和E2 + HRG + HPT处理6 d。培养基每2天换1次，每个样品重复3孔。在第6天，将细胞维持在100 μl培养基中，并加入20 μl CellTiter 96 AQueous One试剂，孵育1 h后，测定样品490 nm处的吸光度。以DMSO处理的样品作为对照。

1.2.3 瞬时转染和荧光素酶报告基因分析 用于鉴定SKBR-3细胞和BT-474乳腺癌细胞对E2和ICI的反应性。采用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)将$pGL_3(ERE)_3$——荧光素酶载体转染SKBR-3细胞和BT-474乳腺癌细胞。1.5×10^5细胞种植于24孔板，孵育过夜。1 μg的报告质粒、1.5 μl的Lipofectamine 2000和适量的OptiMEM (Invitrogen)混合液加入到每个样品孔，孵育4 h后，采用去酚红的，含10% charcoal-dextran处理FBS(CD-FBS)(炭吸附血清)的新鲜培养基配制下列培养液：DMSO对照，1 nmol/L E2处理组，1 nmol/L E2加10 nmol/L ICI组。经过24 h的孵育后，用1×报告子裂解液裂解转染细胞，用荧光素酶检测系统(Promega)测定样品荧光素酶活性。采用Bradford试剂(Bio-Rad)测定蛋白质浓度。以β-actin作为上样对照。

1.2.4 Western blot 为检测BT-474和SKBR-3细胞中ER和HER2的表达，常规培养的BT-474和SKBR-3细胞，PBS洗3次后，用RIPA缓冲液裂解细胞15 min。裂解物4 ℃ 12 000 r/min离心15 min，Bradford试剂(Bio-Rad)测定蛋白质浓度。50 μg细胞裂解物进行SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳后，蛋白质被转移到PVDF膜，然后在含5%脱脂牛奶的TBST缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl，pH = 7.5，150 mmol/L NaCl，0.5% Tween 20)中封闭1 h，膜与ER和HER2抗体(1∶1 000)或抗β-actin抗体(1∶2 000)4 ℃孵育过夜，然后用辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔/鼠二抗，室温孵育1 h，膜经过TBST洗涤3次后，ECL增强化学发光试剂(Thermo)用于最后的检测。

为检测不同处理的条件下两细胞中EGFR/HER2信号通路下游MAPK磷酸化水平，细胞去内源性激素72 h后，然后分别用DMSO、HRG、HRG + HPT、E2 + HRG和E2 + HRG + HPT处理细胞20 min。如前所述采用磷酸化MAPK抗体检测不同处理条件下两细胞中MAPK的磷酸化情况，仍以β-actin作为上样对照。

1.3 统计学处理

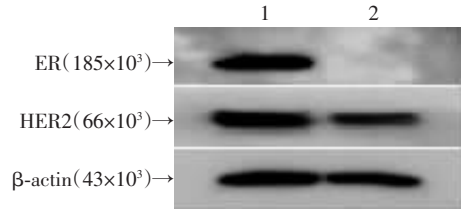
数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 细胞模型的选择和鉴定

Western blot分析BT-474细胞和SKBR-3细胞ER和HER2表达差异。图1可见，BT-474细胞中ER和HER2都表达为阳性；SKBR-3细胞中HER2为阳性，ER表达阴性。采用报告基

因结合瞬时转染分析鉴定两种细胞对 E2 和 ER 拮抗剂 ICI 的反应性。BT-474 对 E2 敏感($P<0.05$),且 ICI 能有效阻断 BT-474 细胞对 E2 的反应性($P<0.05$);SKBR-3 细胞对 E2 和 ICI 均无反应性($P>0.05$)(表 1)。鉴于在 BT-474 细胞中,E2 主要通过 ER 的非基因组效应刺激细胞增殖。因此,我们选择 ER^+ 和 $HER2^+$ 的 BT-474 和 ER^- 和 $HER2^+$ 的 SKBR-3 乳腺癌细胞作为对比研究对象。



1:BT-474;2:SKBR-3

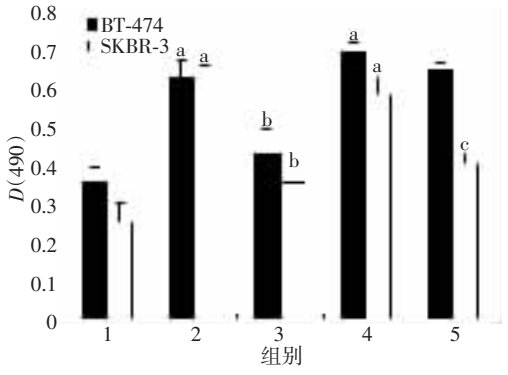
图 1 Western blot 检测 BT-474 和 SKBR-3 细胞中 ER 和 HER2 的表达差异($\bar{x}\pm s$)

表 1 BT-474 细胞和 SKBR-3 细胞对 E2 和 ICI 的反应性

组别	BT-474	SKBR-3
对照	64.556±2.532	0.923±0.087
E2 处理组	254.107±19.529[a]	0.974±0.156
E2+ICI 处理组	41.803±2.138[b]	1.166±0.146

2.2 BT-474 细胞和 SKBR-3 细胞在 E2、HRG 诱导后对 Herceptin 敏感性差异

BT-474 细胞和 SKBR-3 细胞均为 $HER2^+$,因此 HRG 刺激下 BT-474 和 SKBR-3 细胞均增殖迅速;如图 2 所示,HRG 诱导下生长的两种细胞在加入 Herceptin 后细胞数量都明显下降($P<0.01$),即 Herceptin 可有效抑制 BT-474 和 SKBR-3 细胞中 HRG 诱导的增殖。在 HRG 和 E2 共同诱导的以上两种细胞增殖效果与单一 HRG 刺激的增殖效果一致,而细胞加入 Herceptin 后,BT-474 细胞的增殖没有受到明显抑制($P>0.05$),而 SKBR-3 细胞增殖抑制明显($P<0.01$),即在 E2 存在的情况下,ER^+ 的 BT-474 对于 Herceptin 的敏感性远不如 ER^- 的 SKBR-3 的敏感性,表明 E2 通过 ER 非基因组活性干扰了 BT-474 而非 SKBR-3 乳腺癌细胞对 Herceptin 的敏感性。

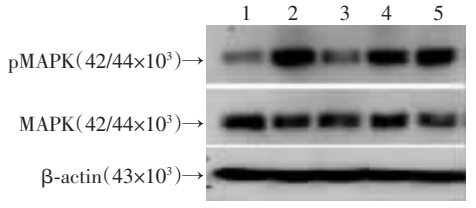


1:对照组;2:HRG 处理组;3:HRG+HPT 处理组;4:E2+HRG 处理组;5:E2+HRG+HTP 处理组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 HRG 处理组比较;c:$P<0.05$,与 E2+HRG 处理组比较

图 2 细胞增殖分析检测 HRG 诱导的 BT-474 和 SKBR-3 细胞在 E2 存在与否的情况下对 Herceptin 的敏感性

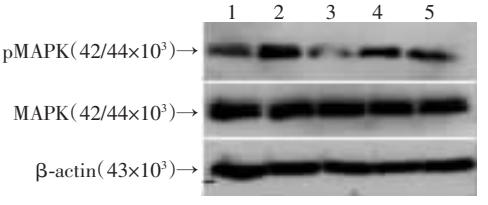
2.3 BT-474 细胞和 SKBR-3 细胞中 HRG 诱导的 MAPK 磷酸化差异

Western blot 分析用于检测 BT-474 细胞在 E2 存在与否的情况下 HRG 诱导的 MAPK 磷酸化改变。见图 3,在 BT-474 细胞中,HRG 和 E2+HRG 两组与对照组比较,磷酸化 MAPK 表达量都上调,单独 HRG 诱导 MAPK 磷酸化水平可以明显被 Herceptin 抑制,但是在 E2 存在的情况下,Herceptin 则不能显现出抑制效果。在 SKBR-3 细胞中,在有无 E2 存在的情况下,Herceptin 均能显著抑制 HRG 诱导的 MAPK 的磷酸化水平(图 4)。表明 E2 可以通过 ER 非基因组活性干扰 Herceptin 对 HRG 诱导的 MAPK 磷酸化的抑制。



1:对照组;2:HRG 处理组;3:HRG+HPT 处理组;4:E2+HRG 处理组;5:E2+HRG+HTP 处理组

图 3 Western blot 检测 BT-474 细胞在 E2 存在与否的情况下 HRG 诱导的 MAPK 磷酸化改变



1:对照组;2:HRG 处理组;3:HRG+HPT 处理组;4:E2+HRG 处理组;5:E2+HRG+HTP 处理组

图 4 Western blot 检测 SKBR-3 细胞在 E2 存在与否的情况下 HRG 诱导的 MAPK 磷酸化改变

3 讨论

HER2/neu/c-ErbB2 癌基因编码表皮生长因子受体超家族中跨膜酪氨酸受体。它可与 Heregulin 等配体的其他 Erb2 家族成员形成活化的、磷酸化异源二聚体,从而激活下游信号级联途径包括 Grb2/Sos/Ras/Raf/MEK/MAPK 途径,PI3K/Akt 途径等,调节靶基因的转录,指导细胞迁移、黏附、增殖、分化、凋亡,且与肿瘤的形成和恶化密切相关[14]。HER2 在乳腺癌的形成中发挥了重要的作用,HER2 的表达状态是临床乳腺癌的一个重要诊断和复发指标。Herceptin/Trastuzumab 是针对 HER2 的人源化单克隆抗体,能有效抑制 HER2 过表达的乳腺癌细胞的生长和增殖[9-10]。但临床 70% HER2 同样过表达的乳腺癌患者对 Herceptin 的治疗没有反应,而且治疗初始对 Herceptin 有效的大多数患者在 1 年内也很快出现 Herceptin 抵抗。目前对 Herceptin 抵抗的机制进行了广泛的研究,但其

机制尚不完全清楚[10-12]，进一步阐明 Herceptin 治疗抵抗机制有利于临床根据乳腺癌患者分子标志的改变选择合理的方案以改善现行的治疗策略。

E2 通过与 ER 的结合，调节了多种靶基因包括影响乳腺细胞生长的相关生长因子的表达，除了通常所指的 ER 基因组活性即经典的 E2 介导的 ER 转录调节外，最近的研究显示，位于细胞膜或细胞质的 ER 还可介导快速的非基因组活性，即通过与信号中间分子相互作用激活生长因子酪氨酸激酶受体如 HER2，导致其下游激酶 MAPK 和 Akt 的活化，活化的 MAPK 和 Akt 可磷酸化位于细胞核的 ER 及其辅调节蛋白，增强 ER 的基因组活性，结果包括 HER2 途径相关基因在内的众多基因的表达被增强，这些基因产物，反过来进一步加强 HER2 途径。ER 可通过非基因组活性与 HER2 途径进行广泛的“串话”或相互作用，特别是 ER 可通过非基因组活性激活 HER2 受体途径，由于作为 Herceptin 治疗靶点的 HER2 受体途径，由于可被位于细胞膜或细胞质的 ER 通过非基因组活性激活，势必增加 Herceptin 的有效抑制剂量，从而减弱 Herceptin 的治疗效果，故我们推测 ER 的非基因组活性可能参与了 ER^+ 乳腺癌细胞 Herceptin 治疗抵抗的产生。已有研究报道，在 COS7 和乳腺上皮细胞，位于细胞膜或细胞质的 ER 还可通过非基因组活性直接与 IGF-1R 和 PI3K/Akt 相互作用，从而激活 IGF-1R、MAPK 和 Akt[15-16]。而如上所述，Akt 和 IGF-1R 的激活，本身就是导致 Herceptin 抵抗表型产生的机制之一。这也可进一步暗示 ER 非基因组活性在 Herceptin 抵抗中的潜在作用。我们选择 ER^+ 和 $HER2^+$ 的 BT-474 乳腺癌细胞和 ER^- 和 $HER2^+$ 的 SKBR-3 作为对比研究对象，初步验证了我们的推测。我们选择 BT-474 乳腺癌细胞作为阳性研究对象的理由是 E2 在该细胞中主要通过 ER 的非基因组效应刺激细胞增殖，同时，即使抗雌激素 tamoxifen 在该细胞中也通过 ER 的非基因组效应表现为雌激素样活性[9]。我们研究的结果显示，在 E2 存在的情况下，Herceptin 对 BT-474 细胞增殖的抑制效应消失，同时，Herceptin 不能降低 HER2 途径下游关键分子 MAPK 的磷酸化；这些现象在 ER^- 和 $HER2^+$ 的 SKBR-3 乳腺癌细胞却不会出现。我们的结果初步表明 E2 可通过非基因组活性影响 ER^+ 的乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果，并可能参与了 Herceptin 抵抗的发生。后期的工作将从 AKt 磷酸化、ER 与 IGF-1R 和 PI3K 相互作用以及在体研究等方面进一步证实 E2 通过 ER 非基因组活性对 ER^+ 乳腺癌 Herceptin 治疗效果的影响以及在 Herceptin 抵抗中的作用机制。

参考文献：

[1] Weigelt B, Reis-Filho J S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(12): 718-730.

[2] Rakha E A, Reis-Filho J S, Ellis I O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 120(2): 293-308.

[3] Bianchini G, Iwamoto T, Qi Y, *et al*. Prognostic and therapeutic implications of distinct kinase expression patterns in different subtypes of breast cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8852-8862.

[4] Miyoshi Y, Murase K, Saito M, *et al*. Prediction of hormone sensitivity for breast cancers[J]. Breast Cancer, 2010, 17(2): 86-91.

[5] Arpino G, Wiechmann L, Osborne C K, *et al*. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance [J]. Endocr Rev, 2008, 29(2): 217-233.

[6] Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13 Suppl 1: S15-S24.

[7] Massarweh S, Schiff R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7): 1950-1954.

[8] Su Q, Hu S, Gao H, *et al*. Role of AIB1 for tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. Oncology, 2008, 75(3/4): 159-168.

[9] Dean-Colomb W, Esteva F J. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(18): 2806-2812.

[10] Garnock-Jones K P, Keating G M, Scott L J. Trastuzumab: A review of its use as adjuvant treatment in human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive early breast cancer[J]. Drugs, 2010, 70(2): 215-239.

[11] Mariani G, Fasolo A, De-Benedictis E, *et al*. Trastuzumab as adjuvant systemic therapy for HER2-positive breast cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2009, 6(2): 93-104.

[12] Bender L M, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer[J]. Front Biosci, 2008, 13: 3906-3912.

[13] Ocana A, Cruz J J, Pandiella A. Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance[J]. Am J Clin Oncol, 2006, 29(1): 90-95.

[14] Moelans C B, de-Weger R A, Ezendam C, *et al*. HER-2/neu amplification testing in breast cancer by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: influence of manual- and laser microdissection [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 4.

[15] Eertmans F, Dhooge W, De-Wever O, *et al*. Estrogen receptor alpha (ERalpha) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) crosstalk in the gonadotropic alphaT3-1 cell line [J]. J Cell Physiol, 2007, 212(3): 583-590.

[16] Mannella P, Brinton R D. Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action[J]. J Neurosci, 2006, 26(37): 9439-9447.

（收稿 2010-10-02 修回 2010-11-19）
（编辑 栾 嘉）