基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1646-05

ErbB2 受体抑制剂 AG825 对 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞增殖的作用及意义

赵婷婷,邓华瑜,赵 敬,杜 佳,陈 黎
(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、干细胞和组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨在 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞中是否存在 NRGs/ErbB2 这种配体作用方式的信号通路活化,进而研究神经调节因子(Neuregulins'NRGs)对 ErbB2 受体信号转导活化和细胞增殖生长的作用。方法:以 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 为研究对象,台盼蓝拒染法检测细胞生长曲线;免疫细胞化学法和 Western blot 法检测细胞中 NRG 的表达。应用 ErbB2 受体功能抑制剂 AG825 处理两株细胞,MTT 法检测比较两株细胞的增殖抑制作用,求出 AG825 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 的 IC_{50}。40 μmol/L AG825 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果:与 MCF-7 细胞比较,MDA-MB-231 细胞具有较强的增殖生长能力。NRG 在 MDA-MB-231 细胞内呈显著表达,MCF-7 细胞中无 NRG 的表达。Western blot 实验检测 MDA-MB-231 细胞可见分子量 44 kD 的 NRG 抗体阳性反应条带。应用 ErbB2 受体功能抑制剂 AG825 后,MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用明显,AG825 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 的 IC_{50} 为 56.59 μmol/L。40 μmol/L AG825 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期($P<0.05$);细胞凋亡增加($P<0.01$)。结论:ErbB2 非过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-231 可能通过 NRGs 自分泌或旁分泌作用方式使 ErbB2 受体信号转导处于激活状态,这与其高增殖、低凋亡恶性行为有关。

【关键词】ErbB2 非过表达乳腺癌细胞;AG825;神经调节因子;增殖
【中国图书分类法分类号】R730.23 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

Effect and significance of ErbB2 kinase inhibitor AG825 on proliferation of non-overexpression ErbB2 breast cancer cell

ZHAO Ting-ting, et al
(*Department of Pathophysiology, Lab for Stem Cell And Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medicial University*)

【Abstract】*Objective*: To explore whether there was activation of NRGs/ErbB2 ligand signal transduction pathway on non-overexpression ErbB2 breast cancer cell in order to investigate the effect of activation and proliferation of NRGs on ErbB2 receptor signal transduction pathway. *Methods*: Non-overexpression ErbB2 breast cancer cell MDA-MB-231 and MCF-7 were studied in the study. Growth curves of the two cell lines were obtained by the trypan blue exclusion method. The expressions of neuregulin were detected by immunocytochemistry and Western blot. MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells were treated with ErbB2 kinase inhibitor AG825, The effect of AG825 on the proliferation was investigated by MTT assay to compare the different effects between the two kinds of cells. The intermediate concentration IC_{50} in 48 hours in MDA-MB-231 cells was determined. MDA-MB-231 cells were treated with 40 μmol/L AG825 for 48 hours, and the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. *Results*: Compared with MCF-7 cells, MDA-MB-231 cells presented strong growth ability. MDA-MB-231 cells expressed a relatively higher level of neuregulin, and MCF-7 cells did not express neuregulin. In the Western blot, the positive reaction band was found in 44 kD which coincided with the molecular weight of NRG in MDA-MB-231 cells. When MDA-MB-231 cells and MCF-7 cells were treated with AG825, MDA-MB-231 cells were inhibited more obviously. The intermediate concentration IC_{50} of AG825 in MDA-MB-231 cells was 56.59 μmol/L. After MDA-MB-231 cells were treated with 40 μmol/L AG825 for 48 hours, the cell cycle was arrested in G_0/G_1 phase ($P<0.05$), and the apoptosis rate was increased ($P<0.01$). *Conclusion*: Our study indicated in MDA-MB-231 cells neuregulins could activate ErbB2 receptor signal transduction pathway by autocrine or paracrine action, which has relation to malignancy behavior of the cells with higher proliferation and lower apoptosis.

【Key words】Non-overexpression ErbB2 breast cancer cell; AG825; Neuregulins; Proliferation

作者介绍:赵婷婷(1982-),女,硕士,研究方向:肿瘤病理生理。
通讯作者:邓华瑜,女,教授,E-mail:cqdenghy@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆医科大学基金项目(XBYB2007089)。

细胞生长分化受多种细胞信号转导调控，ErbB2 受体信号通路起重要作用。ErbB2(HER2 或 neu)基因是一种与乳腺癌发生发展密切相关的原癌基因。ErbB2 定位于 17q21，编码分子量为 185 kD 的跨膜蛋白 p185，具有细胞内酪氨酸激酶样活性，与人类表皮生长因子受体具有高度的同源性，具有很强的转化能力和致癌性[1]。ErbB2 激活的方式有非配体和配体两种，当 ErbB2 基因扩增和蛋白过表达时，不需配体激活，直接诱导 ErbB2 形成同二聚体或异二聚体，活化受体酪氨酸激酶，激活下游信号通路，促进肿瘤细胞的增殖和侵袭转移[2]。在神经调节因子存在时，ErbB2 可通过配体作用方式而激活，这也是目前发现能激活 ErbB2 受体的唯一可能或主要的间接的配体作用方式[3,4]。目前，临床评估 ErbB2 表达状态，免疫组化法检测 ErbB2(+++)或免疫组化法检测(++)/原位荧光杂交法检测(+)者，确定为 ErbB2 过表达[5]。ErbB2 基因的扩增和过表达与乳腺癌预后不良及放、化疗抵抗等密切相关，目前干预和阻断 ErbB2 分子信号转导已成为一种治疗 ErbB2 过表达乳腺癌的有效策略。然而，在乳腺癌患者中有 70%为 ErbB2 非过表达，其中亦有相当大比例的乳腺癌具有高度的侵袭性和恶性特性，其发病机制值得探讨。

神经调节因子(Neuregulins，NRGs)属表皮生长因子类蛋白，是 ErbB3 或 ErbB4 的配体，在多种组织都有表达，对神经系统、心脏等器官发育有重要调节作用[6]。NRGs 直接与 ErbB3 或 ErbB4 结合，然后通过 ErbB3 或 ErbB4 与 ErbB2 构成异二聚体而激活 ErbB2 受体。目前国外研究发现，约 30%的 ErbB2 非过表达乳腺癌有 NRGs 的广泛表达[3,7]，因此可能通过 NRGs 的作用激活 ErbB2 受体信号通路，NRGs/ErbB2 的细胞内信号通路方式可能对 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞增殖起着重要的调控作用。本研究按文献选取 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7[3]，应用 ErbB2 受体功能抑制剂 AG825，探讨在 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞是否存在 NRGs/ErbB2 信号通路的活化，及 NRGs 对细胞增殖生长的作用，为研究 ErbB2 非过表达乳腺癌的发病机制和寻求有效的治疗方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

细胞系：乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 细胞，由本室提供。RPMI1640 干粉培养基：美国 Gibco 公司。新生牛血清：杭州四季清公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)：美国 Sigma 公司。AG825：美国 Biosource 公司，neuregulin 鼠抗人单克隆抗体：美国 Thermo 公司，辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG：Santa Cruz 公司(北京中杉分装)。SP 试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒：武汉博士德生物公司。Western 荧光检测试剂：碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞常规培养于含 10%新生牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中，置于 37℃，5%CO_2 及饱和湿度的孵箱中培养。

1.2.2 台盼蓝拒染法计活细胞数 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞，传代消化制成细胞悬液，经计数后调整细胞密度，各分别接种于 7 个 100 ml 培养瓶内，每瓶细胞数为 3.5×10^5 个细胞，每瓶加入等量培养液。每 24、48、72、96、120、144、168 h 收集 2 株细胞，台盼蓝染色计数活细胞数，以培养时间为横坐标，细胞数为纵坐标绘制生长曲线。重复 3 次。

1.2.3 SP 免疫细胞化学法检测 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞 NRG 的表达 取对数生长期的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞，调整细胞浓度为 5×10^4 个 /ml，进行细胞爬片。当细胞生长到足够密度时，取出爬片，PBS 清洗，75%乙醇固定。采用 SP 法，按试剂盒操作说明进行 NRG 蛋白免疫细胞化学染色，NRG 蛋白单克隆抗体的工作浓度 1:40，设立 PBS 代替一抗的阴形空白对照。DAB 显色后进行苏木素复染细胞核，光镜下观察。

1.2.4 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞，调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml。MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞分别接种于 96 孔培养板，每孔接种细胞悬液 200 μl；MDA-MB-231 细胞设试剂对照组、未加药细胞组、AG825 实验细胞组(设 20、40、60、80 μmol/L 4 个浓度；细胞接种 24 h 后加药)，每组设 3 个平行孔。MCF-7 细胞设试剂对照组、未加药细胞组、AG825 实验细胞组(设 20、40、60、80 、100 μmol/L 5 个浓度；细胞接种 24 h 后加药)，每组设 3 个平行孔。置 37℃、5%CO_2 饱和湿度孵箱内培养。两株细胞各分别培养 24、48 h 和 72 h 后弃上清，每孔加入 MTT 20 μl(5 mg/ml)及无血清 RPMI1640 200 μl 继续培养 4 h，取出后 2 000 r/min 离心 10 min，弃上清，每孔加 200 μl DMSO 震荡 10 min，用酶标仪测定波长 570 nm 的吸光值(D_{570})。实验重复 3 次，取平均值。计算药物在不同浓度、不同作用时间对两株细胞的抑制率。计算公式：细胞生长抑制率 =1-(加药组平均 D_{570}/未加药组平均 D_{570})×100%。根据抑制率，求取 MDA-MB-231 细胞中效浓度，确定后续实验采用药物浓度。

1.2.5 Western blot 检测细胞 NRG 蛋白的表达 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞各 5×10^6 个，裂解细胞，提取总蛋白。用 Bradford 法测定蛋白含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳，转移至 PVDF 膜。脱脂奶粉 37℃封闭 1 h 后与 1:150 NRG 鼠抗人单克隆抗体 4℃孵育过夜，TBST 洗膜后加入 1:2 000 羊抗鼠 IgG/HRP 37℃孵育 2 h。膜用 DAB 显色。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 收集对照组和 AG825 实

验组 MDA-MB-231 细胞（细胞接种 24 h 后加药，培养 48 h），经冷 PBS 离心洗涤 2 次，以 70%冷乙醇 4℃固定 24 h，PBS 洗涤 1 次，加碘化丙啶 PI，4℃避光染色 30 min 后上机检测细胞周期。

1.2.7 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡 收集对照组和 AG825 实验组 MDA-MB-231 细胞（细胞接种 24 h 后加药，培养 48 h），经 PBS 离心洗涤 2 次，将细胞悬浮于 200 μl 结合缓冲液中，加入 10 μlAnnexin V-FITC 和 5 μl PI，轻轻混匀，避光室温反应 15 min，加入 300 μl 结合缓冲液到样品中，混匀后 1 h 内上流式细胞仪检测细胞凋亡率。光源为 488 nm 氩离子激光器，FITC 受激光后发绿色荧光，PI 发红色荧光。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 软件包进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用两独立样本的 t 检验和多样本均数的方差分析，以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞在不同时间点的活细胞计数

MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞在传代后的 24 h 后进入了对数生长期，细胞生长迅速，分别在 120 h 和 96 h 细胞数达到最高峰，细胞数分别为 $(75.23 \pm 1.94) \times 10^5$ 个和 $(38.35 \pm 1.68) \times 10^5$ 个，随后进入下降的缓慢平台期生长阶段，直至进入退化衰亡期（图 1）。

2.2 免疫细胞化学法检测 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中 NRG 的表达

MDA-MB-231 细胞的细胞质和细胞膜呈现棕黄色颗粒均匀分布，细胞核内亦有表达。MCF-7 细胞中未见棕黄色颗粒存在，无 NRG 蛋白表达（图2）。

2.3 Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞 NRG 蛋白的表达

NRG 的分子量为 44 kD，MDA-MB-231 细胞 PVDF 膜显色后在 44 kD 处可见抗体阳性反应条带（见图 3）。MCF-7 细胞未检测到 NRG 蛋白表达。

2.4 AG825 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示：AG825 作用浓度范围为 20~80 μmol/ L，各实验组细胞生长受到明显的抑制（$P<0.01$）。AG825 浓度为 60 μmol/L 时，细胞的抑制率达到最高值，24、48、72 h 最高细胞抑制率分别为 33.24% ± 2.22%、54.52% ± 1.72%、65.67% ± 1.53%。AG825 浓度为 20~60 μmol/ L，随浓度增加、时间延长，抑制率逐渐增加，呈时效、量效依赖关系（$P<0.01$）（见表 1）。

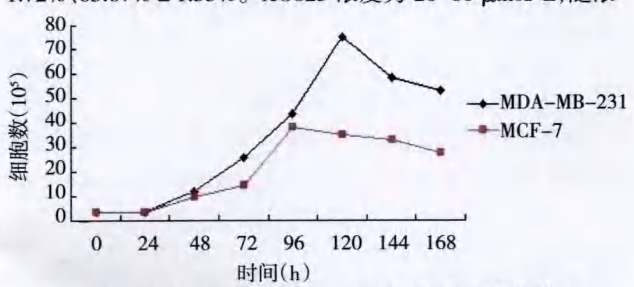


图 1 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞的生长曲线

计算中效浓度（IC_{50}）：直线回归方程 Y=1.11X－12.94，求 AG825 作用 48 h，细胞抑制率 50%的药物浓度（IC_{50}）为 56.59 μmol/L。以下相关实验选用的药物浓度为 40 μmol/L。

2.5 AG825 对 MCF-7 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示：AG825 作用浓度范围为 20~100 μmol/ L，各实验组细胞生长呈现较为一致的一定程度抑制，时效、量效依赖关系不显著。抑制效应主要存在于 AG825 浓度为 60~80 μmol/L 间，按 $P<0.05$ 各组间差异具有统计意义，显示时效、量效关系。AG825 浓度 80 μmol/ L 时出现最高细胞生长抑制率，72 h 为 36.23% ± 1.27%，仅为 MDA-MB -231 细胞最高抑制率的 55%（见表 2）。

2.6 AG825 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

40 μ mol/L AG825 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h，与对照组比较，实验组细胞周期中 G_0/G_1 期细胞比例显著增加（$P=0.001$），S 期（$P=0.011$）和 G_2/M 期（$P=0.029$）细胞比例较明显降低，具有显著性差异（$P<0.05$）。细胞周期阻滞发生在 G_0/G_1 期，并且在 G_0/G_1 期前出现明显的亚二倍体凋亡峰（表 3、图 3）。

2.7 AG825 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

应用流式细胞仪进行细胞早期凋亡分析，结果显示：40 μmol/L AG825 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h，对照组和 AG825 实验组细胞早期凋亡率分别为 0.84% ± 0.04%、2.98% ± 0.07%。与对照组比较，实验组凋亡率明显增加，差异有显著性（$P=0.0001$，$P<0.01$）。

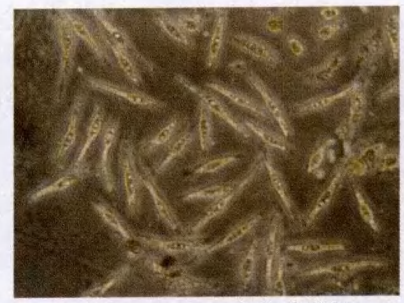
3 讨 论

NRGs 属表皮生长因子（Epidermal growth factor，EGF）类蛋白，是 ErbB3 或 ErbB4 的配体，有 Neuregulin 1（NRG1，NRG），NRG2、NRG3 和 NRG4 4 种亚型，NRG 是 NRGs 家族的主要成员，因在不同实验中分离纯化和克隆，故有不同的名称，如 neu 分化因子（Neu differentiation factor，NDF），Heregulin（HRG），神经胶质生长因子（Glial growth factor，GGF），乙酰胆碱受体诱导活性物质（Acetylcholine receptor-inducing activity，ARIA）和感觉运动衍生因子（Sensory and motor neuron-derived factor，SMDF）[6]。NRGs 直接与 ErbB3 或 ErbB4 结合，然后通过 ErbB3 或 ErbB4 与 ErbB2 构成异二聚体能激活 ErbB2 信号通路，这也是目前发现能激活 ErbB2 受体的唯一可能或主要的间接的配体作用方式[3,4]。NRGs 对细胞的增殖、凋亡、分化、粘连和迁移等多种细胞反应起着重要调控作用。近来国外渐有研究发现，NRGs 在包括肺、卵巢等肿瘤组织中有广泛表达，通过激活下游 MAPK（Mitogen-activated protein kinase）和 PI3K/AKT（Phosphatidylinositol 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog）等信号通路，调控 myc、jun、fosb 等立早基因，促进细胞的增殖[8]。NRGs/ErbB2 形成的异二聚体具有较强的配体亲和力，解离速度慢，能持续活化生长信号及有效延长下游信号活化，在肿瘤恶化进程中发挥重要作用[9]。

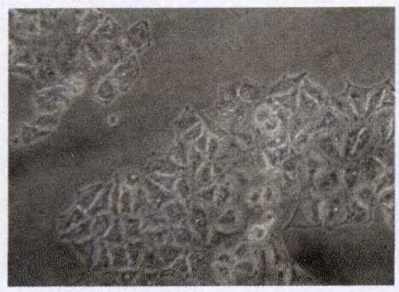
MDA-MB-231 为 ER（-）、高侵袭性的 ErbB2非过表达



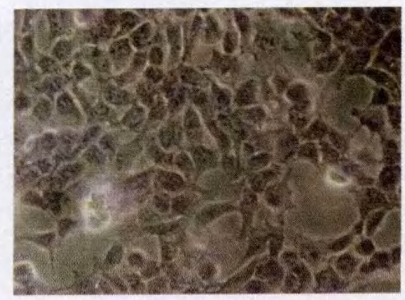
A. MDA-MB-231 细胞空白对照组



B. MDA-MB-231 细胞实验组



C. MCF-7 细胞空白对照组



D. MCF-7 细胞实验组

图 2　MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞中 NRG 的表达(IHC SP 法-DAB 显色 200×)

表 1　不同浓度 AG825 作用不同时间对 MDA-MB-231 细胞生长抑制率($\bar{x}\pm s$, n=12)

AG825	24 h	抑制率(%)48 h	72 h	
20 μmol/L	11.27 ± 3.33	23.29 ± 1.76	29.93 ± 2.66	$F^{■}$=32.74
40 μmol/L	18.23 ± 1.91	33.58 ± 1.59	43.98 ± 2.97	$P^{■}$=0.002
60 μmol/L	33.24 ± 2.22	54.52 ± 1.72	65.67 ± 1.53	
80 μmol/L	24.57 ± 2.31	48.23 ± 1.46	46.62 ± 2.53	
F^{*}=46.41				
P^{*}=0.001				

注:$F^{■}$:AG825 浓度为 20~60 μmol/L 时,时间组之间的方差分析结果,$P^{■}$<0.01;F^{*}:AG825 浓度为 20~60 μmol/L 时,浓度组之间的方差分析结果,P^{*}<0.01

表 2　不同浓度 AG825 作用不同时间对 MCF-7 细胞生长抑制率($\bar{x}\pm s$, n=15)

AG825	24 h	抑制率(%) 48 h	72 h	
20 μmol/L	9.02 ± 2.67	10.35 ± 1.58	9.24 ± 3.46	
40 μmol/L	11.60 ± 1.68	12.79 ± 3.58	12.01 ± 1.36	
60 μmol/L	12.36 ± 0.98▲	18.43 ± 2.87▲	25.50 ± 2.36▲	$F^{■}$=19.91
80 μmol/L	20.69 ± 2.24▲	32.56 ± 3.26▲	36.23 ± 1.27▲	$P^{■}$=0.039
100 μmol/L	15.72 ± 3.78	20.11 ± 3.46	23.65 ± 2.37	
F^{*}=40.49				
P^{*}=0.022				

注:▲为各实验组细胞抑制率差异间有统计学意义,P<0.05;$F^{■}$:AG825 浓度为 60~80 μmol/L 时,时间组之间的方差分析结果,$P^{■}$<0.05;F^{*}:AG825 浓度为 60~80 μmol/L 时,浓度组之间的方差分析结果,P^{*}<0.05

表 3　AG825 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响(%, n=3, $\bar{x}\pm s$)

组 别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	60.83 ± 2.35	32.06 ± 1.71	5.39 ± 1.03
AG825 组	75.01 ± 2.12*	23.04 ± 2.74*	2.51 ± 1.11*

*P<0.05 与对照组比较

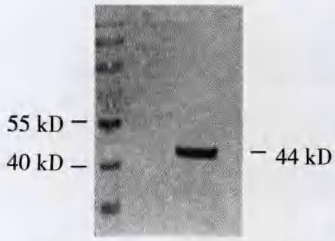
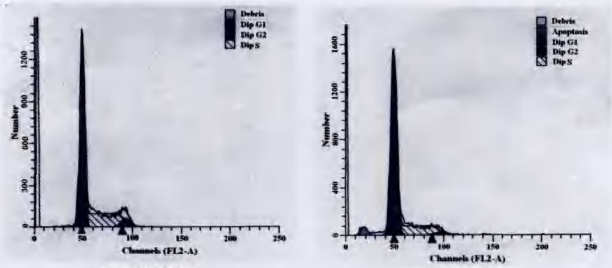


图 3 MDA-MB-231 细胞中 NRG 蛋白的表达



A. 对照组 B. 实验组

图 3 AG825 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

乳腺癌细胞。MCF-7 为 ER(+)、恶性程度较低的 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞。我们通过对两株 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞的生长曲线观察可见,MDA-MB-231 细胞生长迅速,增殖能力强, 生长最高峰的细胞数约为 MCF-7 细胞数的 2 倍,在传代生长至后期 MDA-MB-231 细胞数仍维持在较高的水平,具有很强的生长存活能力,提示 MDA-MB-231 细胞生长过程中可能存在促进其生长的特定调节因素,两株细胞生长特点与文献报道一致。

我们对所选用的 ErbB2 非过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7,以免疫细胞化学法和Western blot 鉴定其 NRG 的表达。观察到 NRG 在 MDA-MB-231 细胞质内和细胞膜明显阳性表达,MCF-7 细胞中未见其表达。Western blot 实验检测 MDA-MB-231 细胞中可见中分子量 44 kD 的 NRG 抗体阳性反应条带,说明 MDA-MB-231 细胞可以合成和分泌 NRG,其主要定位于细胞质;细胞核内也可见其表达。

AG825 为 ErbB2 受体功能抑制剂,可选择性抑制 ErbB2 酪氨酸激酶磷酸化,封闭 ErbB2 的活性,从而阻止 ErbB2 介导的细胞内信号通路及相应效应[10]。应用 AG825 可探讨细胞 ErbB2 受体活化状态和相应信号通路的功能情况。

本实验发现,应用 AG825 可对 MDA-MB-231细胞产生明显增殖抑制效应,作用具有时效、量效依赖关系,作用浓度范围 20~80、60 μmol/L 浓度达到细胞增殖抑制最高值,MDA-MB-231 细胞最高增殖抑制率约为 MCF-7 细胞最高增殖抑制率的 1.8 倍。MCF-7 细胞各实验组在较大的作用范围分布上仅呈现出一定程度的较为一致的增殖抑制效应,时效、量效依赖关系不显著,作用浓度范围为 20~100 μmol/L,抑制效应主要存在于 60~80 μmol/L 间,80 μmol/L 浓度最高细胞增殖抑制率仅为 MDA-MB-231 细胞 60 μmol/L 浓度最高抑制率的 55%。AG825 对 MCF-7 细胞存在这种较弱而一致的抑制效应,可能与 MCF-7 细胞内存在的低水平 ErbB2 磷酸化[11]被阻断,以及细胞内其他酪氨酸激酶磷酸化的非特异性抑制有关。

文献报道 ER(-)或低表达、恶性程度高的乳腺癌细胞通常表现 ErbB2 通路激活[12,13],本实验结果亦与此一致。AG825 作用MDA-MB-231 细胞 48 h,抑制细胞增殖的中效浓度为56.59 μmol/L,故本研究中相关实验选用药物浓度为 40 μmol/L。

我们实验发现,阻断 NRGs/ErbB2 后,流式细胞仪检测可见 MDA-MB-231 细胞增殖发生在 G_1 期停滞,凋亡明显增多。实验结果说明,在 MDA-MB-231细胞,可能通过 NRGs 激活 ErbB2 信号通路促进细胞周期 G_0/G_1 期向 S 期前行,加快 DNA 的合成,促成 MDA-MB-231 细胞高增殖、低凋亡恶性行为。

本实验表明,ErbB2 非过表达、神经调节因子表达的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 ErbB2 受体信号通路处于激活状态,即 MDA-MB-231 细胞可能通过神经调节因子自分泌或旁分泌的配体作用方式激活 ErbB2 信号通路,调节相关基因表达,对促进细胞增殖存活有重要影响。NRG/ErbB2 通路研究为把针对 ErbB2 过表达乳腺癌的曲妥单抗等药物应用到 ErbB2 非过表达乳腺癌提供了理论基础和实验依据。

参 考 文 献

[1] 任庆兰,吴永忠,刘 渝,等.c-erbB2 反义寡核苷酸对人卵巢癌细胞放射敏感性的影响[J].重庆医科大学学报,2003,28(4):421-423.

[2] Cuiling M,Hong L,Stephen S,et al. Overexpress of ErbB2 enhances ethanol-stimulated intracellular signaling and invasion of human mammary epithelial and breast cancer cells in vitro[J].Oncogene,2003,34(22):5281-5290.

[3] Tsai M S,Shamon-Taylor L A, Mehmi I,et al. Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer[J].Oncogene, 2003,22(5):761-768.

[4] Zuleima A,Dennis J S.The transmembrane heregulin precursor is functionally active[J].J Biol Chem,2001,276(47):44099-44107.

[5] 唐发宝,夏 勇.c-erbB-2 过表达对乳腺癌术后化疗选择的影响[J].中华普通外科杂志,2006,21(12):901-902.

[6] Douglas L,Falls.Neuregulins:functions,forms,and signaling strategies[J].Exp Cell Res,2003,284(1):14-30.

[7] Marshall C,Blackburn E,Clark M,et al.Neuregulins 1-4 are expressed in the cytoplasm or nuclei of ductal carcinoma{in situ}of the human breast[J].Breast Cancer Res And Treat,2006,96(2):163-168.

[8] Amin D N,Tuck D,Stern D F,et al. Neuregulin-regulated gene expression in mammary carcinoma cells[J].Exp Cell Res,2005,309(1):12-23.

[9] Madlaina B,Fabrice S,Daniel R,et al. Heregulins implicated in cellular functions other than receptor activation [J].Mol Cancer Res,2006,4(1):27-37.

[10] Murillo H, Schmidt L J,Tindall D J. Tyrphostin AG825 trigger p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells C4 and C4-2[J].Cancer Res,2001,61(20):7408-7412.

[11] 张清媛, 赵文辉, 康欣梅. c-erbB1 c-erbB2 和丝裂原活化蛋白激酶与乳腺癌三苯氧胺耐药的关系[J].中华肿瘤杂志,2006,28(11):826-830.

[12] Gago F E, Fanelli M A, Ciocca D R. Co-expression of steroid hormone receptors(estrogen receptor and/or progesterone receptors) and Her2/neu(C-erbB-2) in breast cancer:Clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006, 98(1):36-40.

[13] Rom J, Aulmann S, Schneeweiss A, et al. Comparison of immunohistological parameters in primary breast cancers and corresponding locoregional recurrences[J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(3):125-130.

(责任编辑:冉明会)