维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0655-03

GA对乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞端粒酶活性的影响

李 霞,邓华瑜,陈 黎

(重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究格尔德霉素(geldanamycin,GA)对乳腺癌细胞增殖和端粒酶活性的影响。方法:培养人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s,应用 MTT 法检测 GA 对 MDA-MB-435s 细胞的生长抑制作用,流式细胞术分析细胞周期,用 TRAP-ELISA 法检测细胞端粒酶活性。结果:不同浓度 GA 对 MDA-MB-435s 细胞增殖有明显抑制作用,呈时效-量效依赖关系,GA 作用后细胞呈现 G2/M 期阻滞,细胞端粒酶活性下降($P<0.05$)。结论:GA 对人乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞增殖具有明显抑制作用,抑制端粒酶活性可能是其发挥抗癌作用的机制之一。

【关键词】乳腺癌;GA;增殖;端粒酶

【中国图书分类法分类号】R735 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-15

Effect of GA on telomerase activity of breast cancer MDA-MB-435s cell

LI Xia, et al

(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of GA on telomerase activity of breast cancer MDA-MB-435s cell. *Methods*: Human breast cancer cell line MDA-MB-435s was used in the study. Proliferation of MDA-MB-435s cells was measured with MTT assay. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The telomerase activity was measured by TRAP-ELISA assay. *Results*: GA inhibited the proliferation of MDA-MB-435s cells on a time- and dose-dependent manner. Aftertreatment of GA, MDA-MB-435s cells arrested at G2/M phase. The telomerase activity of cells was decreasing compared with that of control cells ($P<0.05$). *Conclusion*: GA can prevent breast cancer MDA-MB-435s cells proliferation significantly, which may be related with decreasing the telomerase activity in cells.

【Key words】Breast cancer; GA; Proliferation; Telomerase

格尔德霉素(geldanamycin,GA)属于苯醌安莎霉素类抗生素,是热休克蛋白 90(heat shock protein 90,HSP90)分子伴侣功能的特异性抑制剂。HSP90 在体内可与多种蛋白形成复合体,参与蛋白质的折叠、转运和多聚复合体的组装,在蛋白的成熟、稳定与活化中起重要作用。近年研究表明,HSP90 与辅分子伴侣 p23 可结合到端粒酶催化亚基 hTERT 上,在端粒酶的活化中起重要作用[1]。本实验采用 GA 抑制 HSP90 功能,观察 GA 对乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞生长的影响并检测端粒酶活性的变化,以探讨 GA 对乳腺癌细胞增殖影响的相关作用机制。

作者介绍:李 霞(1975-),女,硕士生,主要研究方向:肿瘤病理生理。

基金项目:重庆科技计划项目(编号:2005AC0075)。

1 材料和方法

1.1 材料

GA 为 Alexis 公司产品,用 DMSO(<0.01%)溶解后用 RPMI-1640 培养液配成 1mmol/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。端粒酶活性检测试剂盒为华美生物工程公司产品。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 RPMI-1640 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 天传代 1 次。

实验分组:未处理组(对照组):用 RPMI-1640 培养液培养。GA 处理组(实验组):细胞接种 24h 开始加药,药物作用 48h 用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖

维普资讯 http://www.cqvip.com

收集对数生长期细胞，调整密度以 1×10^4 个／孔接种于 96 孔培养板，培养 24h，实验组加入 1mmol/LGA 储存液使其终浓度为 100、200、400、800nmol/L，以等量 DMSO 作为试剂对照，每组设 8 个复孔。分别培养 24h、48h 和 72h 后每孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20μl，再培养 4h，弃去上清液，每孔加入 150μl DMSO 溶解沉淀，微型振荡仪振荡 10min 混匀，用酶标仪测定波长 570nm 的吸光值（A），细胞生长抑制率 =（1- 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值）×100%。实验重复 3 次，取平均值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期

实验组细胞经 400、600nmol/L GA 处理 48h。收集细胞，以 -20℃预冷的 75%乙醇固定过夜，PBS 洗涤 2 次后加入碘化丙啶染色液，4℃避光染色 20min 后上机（Macintish650 型）检测细胞周期。

1.2.4 TRAP -ELISA 法检测端粒酶活性

分别收集经 400nmol／L、600nmol／L GA 作用 48h 后的乳腺癌细胞，加入预冷的裂解液 50 μl，混匀放置冰上裂解 30 min，4℃ 14000 r／min 离心 20 min，吸取上清液并转至另一预冷的冻存管内。按试剂盒说明取上清液 2 μl，加入含有 45 μl 的 TRAP 反应混合物，混匀，加入 30μl 液体石蜡，置 25℃水浴保温 30min，在 PCR 仪上经 94℃、2min 灭活后，分别经 94℃ 30s，48℃ 30s，72℃ 90s 共 35 次循环扩增，于 72℃延伸 5min，取扩增产物 25μl 加入含有杂交反应液的微孔板各孔中，混匀，置 37℃恒温反应 1h，加入 TMB 显色剂，37℃避光显色 10min，加入终止液终止反应，测定 450nm 和 690nm 的吸光度 A 值。根据 A=A450-A690 计算。

1.2.5 统计学处理

采用 SAS 8.0 统计学软件进行 t 检验和方差分析，以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 GA 抑制 MDA-MB-435s 细胞生长，抑制作用呈时效量效关系

100、200、400、800nmol/LGA 分别处理 MDA-MB-435s 细胞 24h、48h、72h 后，细胞生长均呈不同程度的抑制，并且呈剂量与时间依赖性。不同浓度和不同时间抑制率之间差异均有显著性（$P<0.05$，表 1，图 1）。

表 1 GA 对 MDA-MB-435s 细胞的生长抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

GA(nmol/L)	抑制率		
	24h	48h	72h
100	0.054 ± 0.007	0.158 ± 0.039	0.204 ± 0.020
200	0.187 ± 0.036	0.276 ± 0.032	0.412 ± 0.051
400	0.384 ± 0.023	0.562 ± 0.052	0.727 ± 0.028
800	0.512 ± 0.012	0.758 ± 0.042	0.926 ± 0.019

注：不同浓度和不同时间之间抑制率比较，$P<0.05$

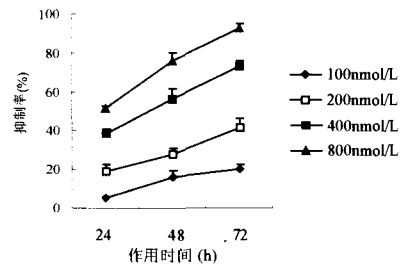


图 1 GA 对 MDA-MB-435s 细胞的生长抑制作用

2.2 GA 阻滞 MDA-MB-435s 细胞周期

流式细胞术分析表明，GA 作用后 MDA-MB-435s 细胞出现 G2/M 期阻滞，随浓度的增大阻滞作用增强。如表 2 所示，G2/M 期细胞在对照组为 12.2%，400nmol/L 实验组增加到 27.34%，当 GA 浓度升高到 600nmol/L 时，G2/M 期细胞上升到 36.77%。实验组与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$，表 2）。

表 2 GA 对 MDA-MB-435s 细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	细胞周期分布（%）		
	G0/G1	S	G_2/M
对照组	60.13 ± 3.56	27.66 ± 3.64	12.2 ± 3.37
GA 实验组			
400nmol/L	66.85 ± 4.02*	5.8 ± 1.40*	27.34 ± 5.02*
600nmol/L	58.31 ± 2.83*	4.92 ± 2.31*	36.77 ± 2.36*

注：实验组与对照组比较，*$P<0.05$

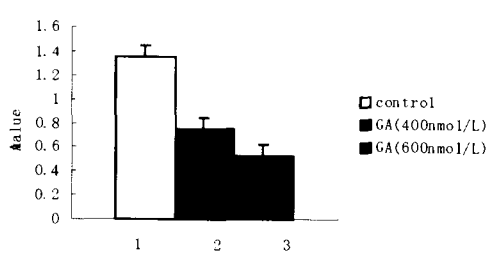
2.3 GA 作用后 MDA-MB-435s 细胞端粒酶活性下降

GA 作用 48h 后，实验组 MDA-MB-435s 细胞端粒酶活性 A 值逐渐降低，与对照组比较差异有显著性（$P<0.05$，表 3，图 3）。

表 3 GA 对 MDA-MB-435s 细胞端粒酶活性的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	A 值
对照组	1.347 ± 0.045
GA实验组	
400nmol/L	0.746 ± 0.023*
600nmol/L	0.521 ± 0.03*

注：实验组与对照组比较，*$P<0.05$



1 对照组 2 GA（400nmol/L）实验组
3 GA（600nmol/L）实验组

图 3 GA 对 MDA-MB-435s 细胞端粒酶活性的影响

注：实验组与对照组比较，*$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

HSP90是真核细胞中广泛存在的一种分子伴侣蛋白，在肿瘤中高表达。许多信号蛋白如类固醇激素受体、受体酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、转录因子和端粒酶都是 HSP90 的效应蛋白[2]，HSP90 与这些蛋白相互作用，维持其正常结构与功能，是肿瘤生长增殖的重要机理。GA 是 HSP90 的特异性抑制剂，可与 HSP90 结合抑制其分子伴侣功能，导致与 HSP90 结合的效应蛋白稳定性下降并在蛋白酶体作用下降解，具有抗癌效应，目前 GA 衍生物 17-AAG 在已进入Ⅱ期临床试验。

端粒酶的异常激活是导致细胞无限增殖和肿瘤发生的重要基础，端粒酶逆转录酶（hTERT）是端粒酶不可缺少的催化亚单位，与端粒酶活性密切相关。HSP90 和 p23 可与端粒酶催化亚基 hTERT 稳定结合，与端粒酶活化有关。不仅端粒酶的组装与活化需要 HSP90 的参与，而且活化后的端粒酶仍需与 HSP90 结合才能保持其活性[1]，这和 HSP90 与其它效应蛋白的结合不一样，其它效应蛋白只在活化过程中需要 HSP90 的参与，活化后则不需要 HSP90 的结合。有资料显示，在人黑色素瘤细胞 JR8 中，GA 和 17-AAG 可抑制 HSP90 与端粒酶活性成分的相互作用[3]。

本实验应用 GA 作用乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞后，结果显示，GA 可抑制细胞生长，使细胞阻滞在 G2/M 期，同时细胞端粒酶活性降低。表明 GA 抑制 HSP90 的功能后可抑制端粒酶的活化，降低端粒酶的活性，导致肿瘤细胞的增殖受抑。HSP90 是癌细胞中生长信号转导通路的枢纽，抑制 HSP90 的功能可破坏癌细胞生存的信号通路网络，端粒酶是 GA 作用的重要靶点。GA 抑制端粒酶活性的机理与破坏 HSP90 与 hTERT 的结合，抑制端粒酶的正确组装有关[4,5]，亦可能与 GA 抑制 Akt 的表达导致hTERT 磷酸化程度的下降有关[3]，尚待进一步研究阐明。

（通讯作者：邓华瑜，023-68485478）

参 考 文 献

[1] Holt SE, Aisner DL, Baur J, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes[J]. Genes Dev, 1999; 13(7): 817-826.

[2] Bagatell R, Whitesell L. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity [J]. Mol Cancer Ther, 2004; 3(8): 1021-1030.

[3] Haendeler J, Hoffmann J, Rahman S, et al. Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein protein interaction and phosphorylation[J]. FEBS Lett, 2003; 536(1-3): 180-186.

[4] Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, et al. Stable Association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with Active Human Telomerase [J]. J Biol Chem, 2001; 276(19): 15571-15574.

[5] Villa R, Folini M, Porta CD, et al. Inhibition of telomerase activity by geldanamycin and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human melanoma cells[J]. Carcinogenesis, 2003; 24(5): 851-859.

（上接第 635 页）

参 考 文 献

[1] Black CP. Systematic Review of the Biology and Medical Management of Respiratory Syncytial Virus Infection[J]. Respiratory Care, 2003; 48(3): 209-233.

[2] Holt PC, Sly PD. Interactions between RSV infection, asthma and atopy: unraveling the complexities [J]. J Exp Med, 2002; 196(10): 1271-1275.

[3] Meissner HC, Rennels MB, Pickering LK, et al. Risk of severe respiratory syncytial virus disease, identification of high risk infants and recommendations for prophylaxis with palivizumab[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004; 23(3): 284-285.

[4] Oddy wH, de Merk NH, Sly PD, et al. The effects of respiratory infections, atopy and breastfeeding on childhood asthma [J]. Eur Respir J, 2002; 19(5): 899-905.

[5] Zhao C-A, Zhao X-D, Yu H-G, et al. Inhibition of respiratory syncytial virus replication in cultured cells by RNA cleaving DNAzyme [J]. Chin J Pediatr, 2003; 41(8): 594-598.

[6] Schmidt AC, Johnson TR, Peter JM, et al. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium-RSV 2003[J]. Virus Research, 2004; 106: 1-13.

[7] McArthur-Vaughan K, Gershwin LJ. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection[J]. J Med Primatol, 2002; 31(2): 61-73.

[8] Lian G-L, Yu H-G, Zhao X-D, et al. Establishment of respiratory syncytial virus infection model in mice[J]. J Xi' an Jiaotong University (Medical Sciences), 2003; 24(4): 329-332.

[9] Ogra PL. From chimpanzee coryza to palivizumab: changing times for respiratory syncytial virus[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000; 19(8): 774-779.

[10] Ottolini MG, Curtis SR, Mathews A, et al. Palivizumab is highly effective in suppressing respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model[J]. Bone Marrow Transplant, 2002; 29(2): 117-120.

[11] Nguyen H, Hay J, Mazzulli T, et al. Efficient generation of respiratory syncytial virus (RSV)-neutralizing human MoAbs via human peripheral blood lymphocyte (hu-PBL)-SCID mice and scFv phage display libraries[J]. Clin Exp Immunol, 2000; 122(1): 85-93.

[12] Ottolini MG, Porter DD, Hemming VG, et al. Effectiveness of RSVIG prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model[J]. Bone Marrow Transplant, 1999; 24(1): 41-45.