维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0322-04

HSP90 在乳腺癌细胞株 ZR-75-30 中的表达及对粘附侵袭能力的影响

罗红霞,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:研究热休克蛋白(Heat Shock Protein,HSP)90 在乳腺癌细胞株 ZR-75-30 中的表达及对该细胞粘附侵袭能力的影响,并探讨相关机制及意义。方法:体外培养 ZR-75-30 乳腺癌细胞株,以 HSP90 抑制剂 Geldanamycin(GA)作用处理;免疫印迹技术(Western-blot)检测 GA 处理前后 HSP90 在乳腺癌细胞株 ZR-75-30 中的表达情况;噻唑兰比色(MTT)法检测 GA 对 ZR-75-30 细胞的增殖抑制作用;噻唑兰比色(MTT)法检测细胞对人工基底膜(Matrigel)的粘附能力变化;Transwell Chamber 法观察癌细胞侵袭、迁移能力的改变。结果:HSP90 抑制剂 GA 对 ZR-75-30 细胞具有增殖抑制作用,呈时间剂量依赖关系;GA作用后 HSP90 在乳腺癌细胞株 ZR-75-30 中表达明显下降;HSP90 抑制剂 GA 处理的乳腺癌细胞 ZR-75-30 的粘附率较未加 GA 的对照组下降明显($P<0.01$);在 GA 未处理对照组侵袭、迁移实验穿膜细胞数分别为 95.4±5.2,103±15.4 与 GA 处理实验组穿膜细胞数 46.2±4.9,52.4±8.4 相比具有显著性差异($P<0.01$)。结论:通过抑制 HSP90 在乳腺癌细胞株 ZR-75-30 中的表达,GA 能明显减弱乳腺癌细胞株 ZR-75-30 增殖粘附侵袭能力,HSP90 与乳腺癌细胞增殖侵袭转移能力相关。

【关键词】乳腺癌细胞;HSP90;Geldanamycin;转移

【中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-21

Expression and effect on invasion and metastasis of HSP90 in human breast cancer cell line ZR-75-30 in vitro

LUO Hongxia, et al

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

【Abstract】*Objective*:To investigate the expression and effect on invasion and metastasis of HSP90 in human breast cancer cell line ZR-75-30 in vitro and the mechanism of anti-invasion. *Methods*: The protein expression level of HSP90 in ZR-75-30 before and after treatment with HSP90 inhibitor Geldanamycin was detected by Western-blotting; The effects of GA on the proliferation, invasion and motility of human breast cancer cell line ZR-75-30 in vitro were explored respectively by MTT colorimetric assay and transwell chamber. *Results*: After treatment with GA the protein expression level of HSP90 in ZR-75-30 was decreased, and the proliferation of ZR-75-30 cells was obviously inhibited in a dose and time-dependent manner. Compared with the control guoup, the adhesion, invasion and motility abilities of the ZR-75-30 cells were decreased significantly ($P<0.01$). *Conclusion*:The results showed that The proliferation and invasive ability of the human breast cancer cell line ZR-75-30 can be suppressed by Geldanamycin and heat shock protein (HSP) 90 is associated with the invasive and metastatic abilities of breast cancer cell.

【Key words】Breast cancer; HSP90; Geldanamycin; Metastasis

热休克蛋白 (Heat Shock Protein,HSP)90 是一种重要的分子伴侣,具有维持蛋白质的空间构象,促进错误蛋白质降解等功能[1]。目前研究发现 HSP90 在多种肿瘤细胞中的表达明显升高[2],并与肿瘤的发生,发展及各种恶性生物学行为关系密切,但其确切关系还未完全阐明。Geldanamycin(GA)属于苯醌安莎霉素类抗生素,是 HSP90 的一种天然抑制剂,能够阻止 HSP90 发挥其功能。本研究利用 GA 进行干预,以了解 HSP90 对乳腺癌细胞株 ZR-75-30 增殖、粘附、侵袭能力的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

作者介绍:罗红霞(1974-),女,硕士生,
主要研究方向:肿瘤侵袭转移。

基金项目:重庆医科大学创新基金(No.cx200319)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 一抗：HSP90 的兔抗人多克隆抗体（武汉博士德公司）；二抗：辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（Santa Cruz 公司）；蛋白分子量标准品（Sigma 公司）；侵袭小室（Transwell Chamber）（美国 Costar 公司）；基质胶 Matrigel（美国 BD 公司）；GA（美国 ALEXIS 公司）；RPMI-1640 培养基（美国 Gibco 公司）；小牛血清（TBD 公司）；四甲基偶氮唑盐（MTT）（上海华舜生物工程有限公司）。

1.1.2 细胞株 乳腺癌细胞株 ZR-75-30（重庆医科大学附属第一院外科教研室惠赠）；NIH 3T3 细胞（本室保存）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 ZR-75-30 细胞接种于含 10%小牛血清和 100U/ml 青霉素，100mg/ml 链霉素，pH7.4 的 RPMI1640 培养基中，置 37℃，5% CO_2 培养箱中常规培养，至对数生长期进行实验。

1.2.2 MTT 法检测 HSP90 抑制剂 GA 对 ZR-75-30 细胞的增殖抑制作用 取对数生长期 ZR-75-30 细胞，调整细胞浓度至 5×10^4 个/ml。每孔种 200μl 细胞悬液于 96 孔培养板内，同时设立试剂对照组、细胞对照组、GA 处理组（设立五个不同浓度：12.5nmol/L、25nmol/L、50nmol/L、100nmol/L、200nmol/L）。每组设 5 个平行孔。置 CO_2 培养箱培养。分别于 24h、48h、72h 后取出 96 孔板，2000r/min 离心 10min，超净工作台无菌条件下弃取上清，加 200μl/孔无血清 1640 及 20μl/孔 MTT，再培养 4h，取出后 2000r/min 离心 10min，弃取上清，加 200μl/孔 DMSO 震荡混匀，待溶解完全后酶标仪比色。抑制率计算公式如下：

抑制率 =（1- 实验组 A_{570} 值 / 对照组 A_{570} 值）× 100%

同时计算出中效浓度 IC_{50} = 34nmol/L，确定 17nmol/L（半量中效浓度）为以后实验浓度。

1.2.3 Western blot 分别取 GA 未作用和作用后的乳腺癌细胞 10^6 个加细胞裂解液 RIPA（TritonX-100，去氧胆酸钠，NP-40，偏钒酸钠，EDTA，EGTA，1×PBS，Aprotine 等）1ml 和 PMSF 10μl 裂解 30min，4℃离心（2000r/min，30min）后取上清。然后加入 1/5 体积的 5× 上样缓冲液经沸水煮沸 5min 处理后以 20μl/道上样进行 10%SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，转移至 PVDF 膜，37℃封闭过夜，加入 1∶500 稀释的兔抗人 HSP90 多克隆抗体 37℃孵育 2h，PBS 清洗 3 次，10min/次，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 2h，清洗 3 次后在 DAB 溶液中显色。β-actin 作内对照。Western-blot 结果用凝胶成像仪扫描进入电脑，用 Quantity One 4.4.0 软件分析，用 HSP90 与 β-actin 的比值表示最终结果。

1.2.4 乳腺癌细胞 ZR-75-30 与基底膜成分粘附能力的测定 将 GA 以 17nmol/L 的浓度加于 RPMI 1640 培养基中，与 ZR-75-30 细胞在 37℃、5% CO_2 条件下共同孵育 48h，经 0.1%胰蛋白酶消化细胞、PBS 洗涤后，以 0.1%BSA-RPMI-1640 调细胞为 5×10^5 个/ml，加入细胞悬液 200μl 于 Matrigel 5μg 包被、2%BSA 封板处理后的 96 孔板；CO_2 培养箱分别孵育 30min、60min、90min、120min 后，弃去培养液，PBS 冲洗除去未粘附的肿瘤细胞；弃 PBS 后加 MTT20μl，以及无血清 RPMI 1640 200μl，CO_2 孵箱孵 3h；吸弃培养上清溶液，DMSO200μl 溶解，噻唑兰显色，酶联免疫检测仪 570nm 测各孔吸光度（A_{570}）值，计算细胞粘附率。同时设立相应的 RPMI-1640 培养对照组。各组重复 3 次。

细胞粘附率 = 实验组 A_{570} 值 / 对照组 A_{570} 值 × 100%

1.2.5 侵袭实验 制备趋化因子：用含 10%的小牛血清的 RPMI 1640 液培养 NIH 3T3 细胞（100ml 培养瓶），37℃、5% CO_2，饱和湿度，当细胞达 80%饱和度时用生理盐水洗 3 次，然后加无血清 RPMI 1640 液 3ml 培养 24h 后收集上清液，离心，-20℃保存备用。

将 Matrigel 按 40μl/孔均匀的铺在 Transwell Chamber 膜上，成胶 30min 置紫外灯下照射过夜，实验前 30min 再次成胶。

ZR-75-30 细胞常规培养，待细胞进入对数生长期后实验组开始加药（GA 17nmol/L），对照组不加药，培养细胞 48h 后，消化，计数，取细胞各 2.0×10^5 个（RPMI 1640 液 0.6ml）接种到成胶的 Transwell Chamber，并将 Transwell Chamber 置于 24 孔板内，24 孔板内加入 NIH 3T3 细胞上清液（趋化因子），每孔 0.6ml；培养 48h 后取出 Transwell Chamber，用棉签头擦掉 Matrigel，PBS 液洗 3 次，95%乙醇固定 15min，HE 染色，揭下 Transwell Chamber 膜反贴在载玻片上。结果判定：在 400 倍光镜下每个滤膜分别计数 5 个视野的穿膜细胞数，计算平均每个视野的细胞数。实验组和对照组重复 3 次。

1.2.6 迁移实验 用 NIH 3T3 细胞上清液作为趋化剂，诱导肿瘤细胞穿过 Transwell 小室内聚炭酯膜，其表面不铺 Matrigel，其余步骤与侵袭实验相同。通过计数穿膜细胞数反映细胞的迁移运动能力。

1.2.7 统计学方法 采用 SAS 8.0 统计软件进行分析。计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 t 检验和方差分析，以 $P<0.05$ 为有显著性差异，$P>0.05$ 为差异没有显著性。

2 结 果

2.1 MTT 法检测不同浓度 GA 对人乳腺癌 ZR-75-30 细胞作用的时效量效关系

随浓度的增加，GA 对细胞的抑制率增大，随时间的延长，抑制率也增加，即抑制作用呈时间 - 剂量依赖性（见表 1）。

2.2 Western-blot 结果

HSP90 抑制剂 GA（17nmol/L）作用 72h 后，未加药和加药后 HSP90 蛋白条带相对光密度值分别为 1.216 ±0.013 和 0.428 ±0.052，HSP90 在 ZR-75-30 细胞中的表达明显下降（见图 1）。

2.3 ZR-75-30 细胞粘附能力的改变（见表 2）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 MTT 法检测不同浓度 GA 作用不同时间对 ZR-75-30 细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$)

GA浓度(nmol/L)	24h抑制率	48h抑制率	72h抑制率
12.5	0.0567 ± 0.0254	0.1125 ± 0.0102	0.1656 ± 0.0869
25	0.1581 ± 0.0188	0.2984 ± 0.0401	0.4110 ± 0.0470
50	0.2762 ± 0.0498	0.3781 ± 0.0611	0.5367 ± 0.0237
100	0.3821 ± 0.0093	0.5214 ± 0.0909	0.7075 ± 0.0345
200	0.4948 ± 0.0635	0.8191 ± 0.0371	0.9113 ± 0.0879

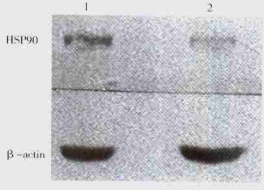
$F = 56.82$ $P < 0.01$; $F' = 104.82$ $P' < 0.01$

注:F 及 P 值为时间组之间比较的方差分析(F 检验)结果;F 和 P 值为浓度组之间比较的方差分析(F 检验)结果。

表 2 MTT 法测得 GA(17nmol/l)对 ZR-75-30 细胞作用后的粘附率($\bar{x} \pm s$)

组别	30min	60min	90min	120min
对照组	0.2786 ± 0.0336	0.5203 ± 0.0389	0.6133 ± 0.0899	0.7347 ± 0.0543
药物处理组 *	0.1399 ± 0.0185	0.2540 ± 0.0570	0.4147 ± 0.0067	0.5440 ± 0.0652

注:与对照组比较有显著差异,*$P < 0.01$



1:未处理组 ZR-75-30 细胞蛋白表达水平

2:实验组 ZR-75-30 细胞蛋白表达水平

图 1 HSP90 在 ZR-75-30 乳腺癌细胞中的蛋白表达 (Western-blot)

随着时间的延长,细胞粘附能力增加。ZR-75-30 细胞加药组比未加药组在各时间点上粘附率下降明显($P < 0.01$)(见表 1)。

2.4 GA 对 ZR-75-30 细胞侵袭和迁移能力的影响

GA 处理 48h 后 ZR-75-30 细胞侵袭能力与正常对照组相比有明显差异($P < 0.01$)(见表 3 和图 2、图 3)。

表 3 GA(17nmol/L)对 ZR-75-30 细胞侵袭、迁移能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	侵袭穿膜细胞数	迁移穿膜细胞数
对照组	95.4 ± 5.2	103 ± 15.4
药物处理组	46.2 ± 4.9*	52.4 ± 8.4*

注:与对照组比较有显著差异,*$P < 0.01$

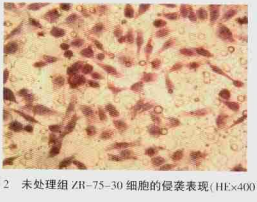


图 2 未处理组 ZR-75-30 细胞的侵袭表现(HE×400)



图 3 GA(17nM)实验组 ZR-75-30 细胞的侵袭表现 (HE×400)

3 讨 论

侵袭、转移是恶性肿瘤的重要的生物学行为,该过程受多因素调控,涉及肿瘤细胞的恶性增殖,肿瘤组织新生血管的生成,肿瘤细胞粘附,分泌蛋白酶降解细胞外基质及肿瘤细胞迁移运动等一系

维普资讯 http://www.cqvip.com

列过程。HSP90（Heat Shock Protein，HSP）是体内一种重要的分子伴侣，它可以和一系列参与调节肿瘤细胞生长、发育及各种恶性生物学行为的激酶分子和转录因子结合形成复合物，并调节这些底物蛋白的稳定性和功能，因此目前已成为抗癌研究的热点之一。苯醌安莎霉素类抗生素 Geldanamycin（GA）由于具有抑制 HSP90 功能的作用已被开发成为一种抗癌新药，它的衍生物 17- 烯丙胺 -17- 脱甲氧格尔得霉素（17-allylamino-17-desmethoxygel-danamycin，17-AAG）在国外开始进入Ⅱ期临床实验[3]。GA 对体外的肿瘤细胞和动物模型均显示很强的抗肿瘤活性，文献报道它可以抑制 60 多种癌细胞的增殖[4]，亦出现关于抑制肿瘤侵袭转移方面相关报道，Rousseau 等发现 GA 可以抑制肿瘤细胞的血管生成和移动[5]；Shimada 发现 GA 可抑制 HL-60 肿瘤细胞转移的粘附功能[6]。这些研究均显示 HSP90 与恶性肿瘤的侵袭、转移存在密切关系。

HSP90 与乳腺癌侵袭转移之间的关系鲜有报道。本研究利用 HSP90 抑制剂 GA 进行干预，发现 GA 可以抑制 HSP90 在乳腺癌 ZR-75-30 细胞中的表达，HSP90 表达被抑制以后 ZR-75-30 细胞的增殖受到抑制，该抑制作用呈时间剂量依赖关系，纳摩尔水平产生效应，中效浓度为 34nmol/L；进一步研究证实 HSP90 被抑制以后乳腺癌 ZR-75-30 细胞的粘附、侵袭、迁移运动能力均明显减弱，因此 HSP90 可以影响乳腺癌细胞的增殖及侵袭转移行为的多个环节。

有研究显示在乳腺癌细胞中 HSP90 可以和调节肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭转移的雌激素受体（Estrogen Recepter，ER）、肿瘤抑制因子 P53，抗凋亡激酶 AKT、Raf-1 激酶、血管转录因子 Hif-1α、受体酪氨酸激酶 ErB2 和 EGFR 结合形成复合物[7]，并调节它们的活性和功能，本研究也明确看到通过抑制 HSP90 的表达，可以抑制 ZR-75-30 乳腺癌细胞的增殖、粘附、侵袭能力，HSP90 可能通过影响多个底物蛋白来影响乳腺癌的侵袭、转移能力，但 HSP90 影响乳腺癌细胞侵袭、转移能力的具体作用机制还需要进一步的研究证实。HSP90 不但作为分子伴侣对肿瘤细胞生长起着保护作用，而且可在多方面多层次上影响肿瘤的恶性转化和各种恶性生物学行为，因此阐明 HSP90 在肿瘤细胞中的作用机制具有重要意义，并为以 HSP90 为靶点的抗癌治疗提供理论支持。

（通讯作者：邓华瑜 Tel：023-68817865 E-mail：cq-denghy@yahoo.com.cn）

参 考 文 献

[1] 刘 炎，左 伋.分子伴侣功能的研究进展 [J]. 国外医学遗传学分册，2002;25(2):70-73.

[2] Richter K, Buchner J. HSP90: chaperoning signal transduction [J]. J Cell Physiol, 2001;188:281-290.

[3] Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90[J]. J Mol Med,2004;82(8):488-499.

[4] Supko JG, Hickman RL, Grever MR, et al. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agenl[J]. Cancer Chemother pharmacal, 1995;36:305-310.

[5] Rouseeau S, Horle F, Kotanides H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and required concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase [J]. J Biol Chem, 2000;275(14):10661-10672.

[6] Shimada Y, Ogawa T, Sato A, et al. Induction of differentiation of HL-60 cells by the anti-fungal antihiotic, radicicol [J]. J Antibiot,1995;48(8):824-830.

[7] Beliakoff, Jasona; Whitesell, Lukeb. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy[J]. Anti-Cancer Drugs, 2004;15(7):651-662.