维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)01-0055-03

HSP90 的抑制剂 Geldanamycin 对乳腺癌细胞侵袭、转移能力的影响

罗红霞，邓华瑜，郑维萍

（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：探讨 HSP90 抑制剂 Geldanamycin（GA）对高转移性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-435s 侵袭、转移能力的影响。方法：噻唑兰比色（MTT）法检测两株细胞对人工基底膜（Matrigel）的粘附能力变化；Transwell Chamber 体外侵袭运动实验研究 GA 处理前后 MDA-MB-231、MDA-MB-435s 细胞侵袭、运动能力的改变。结果：GA 处理后的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435s 细胞的粘附、侵袭、运动能力与未处理组细胞相比均明显下降，差异具有显著性（$P<0.05$ 和 $P<0.01$）。结论：HSP90 抑制剂 Geldanamycin（GA）能够明显抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-435s 粘附、侵袭和运动能力。

【关键词】乳腺癌细胞；Geldanamycin；HSP90

【中国图书分类法分类号】R363 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-07-08

Effect of HSP90 inhibins geldanamycin on invasion and metastasis of human breast cancer cell line

LUO Hongxia, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effects of HSP90 inhibitors Geldanamycin (GA) on invasion and motility potential in human breast cancer cell. *Methods*: The effects of HSP90 inhibitor GA on the adhesion、invasion and metastasis of human breast cancer line MDA-MB-231 and MDA-MB-435s in vitro were explored by MTT colorimetric and transwell chamber. *Results*: Treatd with GA, the adhesion、 invasion and motility abilities of the MDA-MB-231 and MDA-MB-435s cells were decreased significantly as compared with the control guoup, ($P<0.05$ and $P<0.01$). *Conclusion*: The abilities of adhesion、invasion and motility of breast cancer cells can be suppressed by the inhibition of GA.

【keywork】Breast cancer cell; Geldanamycin; HSP90

Geldanamycin(GA)是以 HSP90 作为分子靶点发展起来的一种抗癌新药。目前它的衍生物 17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔得霉素（17-allylamio-17-desmethoxygel-danamycin，17-AAG）在美国已通过Ⅰ期临床实验，开始进入Ⅱ期临床实验[1]。以往大量的研究均已证实 GA 对乳腺癌细胞的增殖、凋亡、免疫等各方面均有重要作用[2]，但 GA 与乳腺癌侵袭转移方面的关系的报道却很少。本实验采用 MTT 法和 Transwell Chamber 体外侵袭运动实验来研究 GA 与乳腺癌细胞侵袭转移方面的关系。

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）。

1 材料与方法

1.1 材料

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）；DMSO（Sigma 公司）；RIPM-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）；乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-435s（重医附一院外科教研室惠赠）；NIH3T3 细胞（本室提供）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MDA-MB-231、MDA-MB-435s 细胞接种于含 10%小牛血清，pH7.4 的 RIPM-1640 培养基中，置 37℃，5% CO_2 培养箱中培养，至对数生长期进行实验。

1.2.2 乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 与基底

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜成分粘附能力的测定将 GA 以 16nmol/L 和 27.2nmol/L 的浓度分别加于 RIPM-1640 培养基中，分别与 MDA-MB-435s 细胞和 MDA-MB-231 细胞在 37℃、5% CO_2 条件下共同孵育 72h，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 MTT 20μl，以及无血清 RPMI-1640 200μl，CO_2 孵箱孵 3h；吸弃培养上清溶液，DMSO 200μl 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%

1.2.3 侵袭实验

实验分组 对照组：不加药，每天换 RPMI-1640 培养液；实验组：细胞进入对数生长期后开始加药，分别用含 19.1nmol/L 和 50nmol/L 的 GA 的培养液分别培养 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞 72h 后用于实验，每 24h 换液以维持药物浓度。

制备趋化因子：用含 10%的小牛血清的 RPMI-1640 液培养 NIH3T3 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。

侵袭实验[3]：将 Matrigel 按 40μl/ 孔均匀的铺在 Transwell Chamber 膜上，成胶 30min 后置紫外灯下照射过夜，实验前 30min 再次成胶。取对照组和实验组细胞各 2.0×10^5 个（RPMI-1640 液 0.6ml）分别接种到成胶的 Transwell Chamber，并将 Transwell Chamber 置于 24 孔板内，同时在 24 孔板内加入 NIH3T3 细胞上清液（趋化因子），每孔 0.6ml，培养 48h 后取出 Transwell Chamber，用棉签头檫掉 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：400 倍光镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞数，取均值。实验重复 3 次。

1.2.4 迁移实验 用 NIH3T3 细胞上清液为趋化剂，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。通过计数穿过膜的细胞数即可反应细胞的迁移能力。

1.3 统计学方法

采用 SAS 8.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞粘附 Matrigel 能力的影响（见表 1 和表 2）

随着时间的延长，MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞粘附在 Matrigel 上的能力增加。GA 实验组的粘附能力低于对照组，差异有非常显著性意义（$P<0.01$）。

2.2 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响

GA处理后，两株细胞的侵袭迁移能力均显著下降，但 MDA-MB-435s 细胞下降更为明显（见表 3 和图 1～4）。

3 讨 论

Geldanamycin（GA）属于苯醌安莎霉素类抗生素，它在结构上主要是由一个苯醌部分和一个平面性大环安莎桥相连。它是一个天然产物，最早是在 20 世纪 70 年代从放射菌肉汤中分离得到，但直到 20 世纪 80 年代才发现该化合物具有抗肿瘤活性。

表 1 MTT 法测得 MDA-MB-435s 细胞不同时间的粘附率（$\bar{x}\pm s$）

Group	30min	60min	90min	120min
Control	0.254 ± 0.036	0.476 ± 0.021	0.667 ± 0.026	0.829 ± 0.061
GA**	0.143 ± 0.032	0.239 ± 0.025	0.400 ± 0.067	0.532 ± 0.026

与对照组比较：**$P<0.01$

表 2 MTT 法测得 MDA-MB-231 细胞不同时间的粘附率（$\bar{x}\pm s$）

Group	30min	60min	90min	120min
Control	0.263 ± 0.080	0.536 ± 0.035	0.762 ± 0.041	0.978 ± 0.025
GA**	0.167 ± 0.014	0.379 ± 0.015	0.525 ± 0.038	0.812 ± 0.036

与对照组比较：**$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 GA 对 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响

分组		侵袭穿膜细胞数	迁移穿膜细胞数
A	MDA-MB-435s正常组	113.2 ± 6.4187	132.6 ± 6.5803
B	MDA-MB-435s加药组	41.2 ± 9.0388**	57.8 ± 9.4181**
C	MDA-MB-231正常组	120.4 ± 12.6412	140.4 ± 10.5024
D	MDA-MB-231加药组	101.0 ± 5.2440*	118.0 ± 11.7260*

注:B 与 A 组比较 **$P<0.01$; D 与 C 组比较 *$P<0.05$。

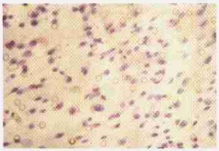


图 1 未处理组 MDA-MB-435s 细胞侵袭表现(HE×400)

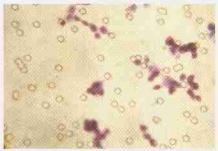


图 2 GA 组 MDA-MB-435s 细胞侵袭表现(HE×400)

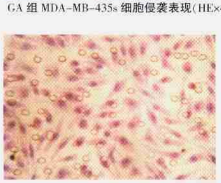


图 3 未处理组 MDA-MB-231 细胞侵袭表现(HE×400)

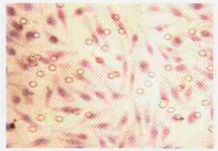


图 4 GA 组 MDA-MB-231 细胞侵袭表现(HE×400)

最初这类化合物被认为是酪氨酸激酶的抑制剂,然而它的抗肿瘤作用却无法用该机制进行解释,随着深入研究,发现它可以竞争 HSP90 的 ATP 结合位点,抑制 HSP90 的内源性 ATP 酶活性,从而抑制 HSP90 的功能[4]。大量研究证实 HSP90 可以和一系列信号转导途径中的激酶分子和突变蛋白质结合并调节它们的稳定性和功能,因此 HSP90 对肿瘤的发生发展有着密切的关系[5]。GA 通过抑制 HSP90 的功能可能导致信号转导途径中的激酶分子和突变蛋白质被蛋白水解酶降解,达到抗肿瘤的作用。

侵袭转移是恶性肿瘤的重要生物学特性,也是肿瘤难以治愈的原因之一。侵袭转移的发生是一个多步骤多因素连续的过程,其基本环节主要包括①肿瘤血管的形成②癌细胞从原发灶脱落③与细胞外基质、基底膜发生粘附并降解④穿越血管壁进入循环并达到远处部位⑤在继发部位不断增殖形成转移灶。侵袭与运动是关键环节之一。有研究发现 GA 的衍生物 17-AAG 可以显著抑制转移性肺癌 H322 和 H358 细胞在趋化因子作用下的迁移通过 Matrigel 的能力[6]。Park 等的实验发现 GA 可以抑制 EGF 诱导的甲状腺癌细胞的侵袭转移能力[7],提示 GA 抗肿瘤侵袭转移作用存在。本研究选用 Transwell Chamber 体外侵袭运动实验证实 GA 对 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435s 两株高转移的乳腺癌细胞株对人工基底膜的粘附、侵袭和运动能力均有明显的抑制作用,GA 可以抑制乳腺癌的侵袭转移,具体机制还不甚清楚。本研究提示 GA 可能通过抑制 HSP90 的功能从而影响肿瘤侵袭转移的过程。

参 考 文 献

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

(下转第 73 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

速诱导基因 c-jun 和 jun-B mRNA 的表达以及增强激活蛋白 AP-1 DNA 的活性，来发挥其刺激胃癌等肿瘤细胞的增殖作用；由此可见，BOM 能够促使胃癌 G_0 期细胞进入 G_1 期、S 和 M 期，理论上 MMC 联合 BOM 用于胃癌的化疗，更有利于 MMC 发挥诱导胃癌细胞凋亡并最终杀灭的作用。

在体外 BOM 和 MMC 单独作用于胃癌细胞，BOM 能使 G_0 期的胃癌细胞进入增殖期，而 MMC 对增殖期的胃癌细胞具有明显杀伤作用；如将两者联合作用于胃癌细胞，应表现出更强的杀伤作用。本研究结果提示，M + B 组的细胞抑制率和凋亡率均高于 M 组，其差异均具有显著性（$P<0.05$）；这说明 MMC 可以有效地抑制由 BOM 所导致的 DNA 合成和胃癌细胞的增殖作用，从而促使胃癌细胞凋亡。因此，应用化疗药物 MMC 联合 BOM 有良好的协同作用，可有效诱导胃癌细胞凋亡，提高抗癌的疗效；但 BOM 有促进胃癌细胞增殖的作用，BOM 和 MMC 联合使用，在体内的利弊还有待多方面的深入研究研讨。

国内学者陈嘉勇[7]等人用生长激素联合抗癌药奥沙利铂体外干预胃癌细胞生长，得出生长激素与抗肿瘤药合用可以增强抗肿瘤药对胃癌细胞的杀伤作用；其原理与本研究相似。国外 Szepeshazi[6]等人证实，蛙皮素细胞毒性模拟剂 AN-215 能抑制此类肿瘤的生长；Terry[8]等也研究了高亲和力喜树碱 - 蛙皮素共扼物，此类物质对具有蛙皮素受体的肿瘤细胞有细胞毒性作用。利用共扼物治疗肿瘤，是肿瘤治疗学中新的发展方向，即制备抗癌药与相关激素的共扼物，通过与肿瘤细胞膜上激素受体的结合，对肿瘤细胞起杀伤作用。对于丝裂霉素 C，是否可以制备丝裂霉素 - 蛙皮素共扼物，其蛙皮素能使胃癌细胞从 G_0 期进入 G_1 等期，以利于丝裂霉素作用于胃癌细胞，使其死亡或凋亡，这些都有待进一步去探讨或尝试。本研究结果提示蛙皮素与丝裂霉素有协同效应，但还有很多问题比如对其具有蛙皮素受体的正常细胞是否具有杀伤作用，其作用的机制及强度，体内给蛙皮素是否会导致胃癌病情的加重或促进其转移，等等诸多问题有待更深入研究。

参 考 文 献

[1] 段 红.5- 氟脲嘧啶及丝裂霉素 C 对人胃癌细胞株 SGC-7901 及 BGC-823 的相互作用的体外观察[J]. 中国病理生理杂志, 2002;18(3):259-261.

[2] 李景南.蛙皮素对人胃粘膜上皮永生细胞系 cyclin D_1/ cdk4 的影响[J]. 中华内科杂志, 2001;40(6):374-376.

[3] 孙 涛. 蛙皮素对人胃黏膜上皮永生细胞系 GES-1 细胞生长作用和机制的研究 [J]. 中华消化杂志, 2003;23(6):327-331.

[4] Valeria P, Makarenkova, Galina V, et al. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells[J]. Journal of Neuroimmunology, 2003;145:55-67.

[5] GIBOM J B. Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling[J]. Clin Invest, 2000;105(1):9.

[6] Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A, et al. Preclinical evaluation of therapeutic effects of targeted cytotoxic analogs of somatostatin and bombesin on human gastric carcinomas[J].Cancer, 2003;98(7):1401-1410.

[7] 陈嘉勇. 生长激素在体外对人胃癌细胞的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004;21(5):521-523.

[8] Terry W, Moody, Samuel A, et al. Development of High Affinity Camptothecin-Bombesin Conjugates That Have Targeted Cytotoxicity for Bombesin Receptor-containing Tumor Cells[J]. J. Biol. Chem., 2004; 279(22): 23580-23589.

（上接第 57 页）

488-499.

[2] Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E . Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity[J]. Invest New Drugs , 1999 ;17:361-373.

[3] Thompson EW, Reich R, Shima TB, et al. Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens[J]. Cancer Res, 1988;48:6764-6768.

[4] Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, et al. Structural basis for inhibition of the HSP90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin [J]. J Med Chem, 1999;42:260-266.

[5] Solit DB, Scher HI, Rosen N. Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer [J]. Semin Oncol, 2003;30(5):709-716.

[6] Nguyen DM, Desai S, Chen A, et al. Modulation of metastasis phenotypes of non-small cess lung cancer cells by 17-allylamio-17-desmethoxygel-danamycin [J]. Ann Thoracsurg,2000;70(6):1853-1860.

[7] Park Fin-Woo, Yeh Michael W, Wong Mariwil G, et al. The heat shock protein90-binding geldanamycin inhibits cancer cell proliferation, down-regulates oncoproteins,and inhibits epidermal growth factor-induced invasion in thyroid cancer cell lines[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003;88(7):3346-3353.