

赫赛汀对乳腺癌 SK-BR3 细胞 Notch-1 信号通路的影响及意义

韩 铭 邓华瑜 隆 玲 姜 蓉

摘要 目的:探讨赫赛汀对乳腺癌 SK-BR3 细胞 Notch-1 蛋白的影响及其作用机制,认识 Notch-1 信号通路在乳腺癌细胞形成赫赛汀耐药中的意义。方法:选用 HER-2 过表达乳腺癌 SK-BR3 细胞及 HER-2 非过表达乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,免疫细胞化学法和 Western blot 法检测两细胞株中 Notch-1 蛋白的表达;应用赫赛汀处理 SK-BR3 细胞,Western blot 法检测 HER-2、Notch-1 通路活性分子 Notch-1^{IC} 的蛋白表达;RT-PCR 法检测 Notch-1 靶基因 HES-1 mRNA 的表达;免疫共沉淀法检测 SK-BR3 细胞中 Notch-1 与 HER-2 是否存在相互作用。结果:Notch-1^{IC} 核定位水平及 Notch-1^{IC} 蛋白表达水平在 HER-2 过表达乳腺癌细胞 (9.37 ± 0.64) 中明显低于 HER-2 非过表达乳腺癌细胞 (21.665 ± 1.11), $P < 0.01$;赫赛汀处理 SK-BR3 细胞后,与未处理组比较,细胞内 Notch-1^{IC} 蛋白及 HES-1 mRNA 水平均明显增高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),HER-2 蛋白表达水平在处理前后未发生明显变化 ($F = 0.973$, $P > 0.05$);免疫共沉淀结果显示 Notch-1 与 HER-2 蛋白之间存在共沉淀。结论:Notch-1 蛋白在 HER-2 过表达乳腺癌细胞中活性下降;HER-2 与 Notch-1 结合,可能负性调控 Notch-1;赫赛汀活化的 Notch-1 信号通路,可能与细胞耐药发生有关。

关键词 Notch-1 赫赛汀 乳腺癌 免疫共沉淀

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.11.007

Influence and Significance of Herceptin on the Notch-1 Signaling Pathway in Breast Cancer SK-BR3 Cells

Ming HAN¹, Huayu DENG, Ling LONG, Rong JIANG

Correspondence to: Huayu DENG, E-mail: cqdenghy@yahoo.com.cn

Department of Pathophysiology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Objective: To investigate the effects and mechanism of action of herceptin on Notch-1 protein in breast cancer SK-BR3 cells, and to explore the significance of Notch-1 signaling pathway in breast cancer cell resistance to herceptin. **Methods:** The breast cancer cells SK-BR3 with HER2 overexpression and MDA-MB-231 overexpression with HER2 non-overexpression were selected. Immunocytochemistry and Western-blot analysis were used to detect the expression of Notch-1 protein and activate Notch-1 (Notch-1IC) in the SK-BR3 and MDA-MB-231 cells, respectively. SK-BR3 cells were treated with herceptin. Western blot analysis was used to detect the expression of Notch-1IC and HER2 proteins. Reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to assay HES-1 mRNA expression. Co-immunoprecipitation detected the interaction between HER2 and Notch-1 proteins in the SK-BR3 cells. **Results:** The level of Notch-1IC nucleic localization and the expression of Notch-1IC protein in SK-BR3 cells (9.37 ± 0.64) were significantly lower than in the MDA-MB-231 cells (21.665 ± 1.11) ($P < 0.01$). SK-BR3 cells were treated with herceptin. Compared with the controls, the expression of Notch-1IC protein and HES-1 mRNA was significantly increased ($P < 0.01$). There was no apparent change in HER2 protein expression after herceptin treatment ($F = 0.973$, $P > 0.05$). Co-immunoprecipitation showed coprecipitation between the Notch-1 and HER2 proteins. **Conclusion:** The activity of Notch-1 protein was decreased in the breast cancer cells with HER2 overexpression. HER2 could combine with Notch-1, thereby negatively regulating Notch-1 activity. Herceptin could increase the activity of Notch-1, which could be associated with the cell resistance.

Keywords Notch-1; Herceptin; Breast cancer; Co-immunoprecipitation

表皮生长因子受体2(HER-2/neu)蛋白属于酪氨酸激酶受体家族成员,25%~30%的乳腺癌患者存在过表达或过度激活^[1]。研究表明 HER-2 的过表达与乳腺癌预后差、侵袭性高密切相关^[2]。赫赛汀(曲妥珠单抗, Herceptin)是人源化单克隆抗体,可与

HER-2 蛋白胞外段特异性结合,抑制其下游信号通路,发挥抗肿瘤作用。但是,赫赛汀的单独治疗客观反应率不高,仅有 12%~34%。研究表明有近 50% 的患者在使用该药初期即产生了耐药性,多数患者在 1 年之内就发生了耐药^[3]。肿瘤对赫赛汀耐药的机制

引起了研究者们极大的关注。

Notch蛋白是一组高度保守的I型单次跨膜蛋白。在哺乳动物中,Notch受体有4个同源体(Notch-1~4),由胞外区(Notch^{EC})、跨膜区(NotchTM)和胞内区(Notch^{IC})组成。其中胞外区由若干个串联的表皮生长因子重复序列(EGF-like repeats)和3个Lin/Notch-1重复序列(Lin/Notch-1 repeats, LNR)组成,EGF样重复序列介导了Notch-1受体与配体的相互作用。Notch配体包括5种,分别是DLL-1、-2、-4, JAG-1、-2。Notch信号通路通过邻近细胞膜上配体与受体相结合,经过3次蛋白水解,其胞内段Notch^{IC}作为活性分子进入细胞核,活化转录抑制因子CSL(又称CBF1或RBP-J κ),启动Notch靶基因的转录。Notch最主要的靶基因是HES和HEY,还涉及p21、cyclin D1、c-Myc、NF- κ B2及有关调节凋亡的因子^[4]。研究表明,在乳腺癌中Notch-1起着癌基因的作用,可抑制肿瘤分化、促进肿瘤增殖及抑制凋亡等^[5]。Notch信号通路与其他多条肿瘤发生相关信号通路存在交互影响,具有广泛的促癌效应,其胞外段特有的结构可能与HER-2结合,在乳腺癌形成赫赛汀耐药中可能有重要作用。

本研究选用HER-2过表达的乳腺癌细胞SK-BR3和非过表达的MDA-MB-231细胞,比较两种细胞株中Notch-1活性的差异,研究分析HER-2与Notch-1在蛋白表达和相互作用上的关系,应用赫赛汀处理乳腺癌SK-BR3细胞,研究Notch-1蛋白活化引起Notch-1^{IC},以及靶基因HES-1的表达变化情况,探讨Notch-1信号通路在赫赛汀处理乳腺癌细胞后的变化和机制,为认识赫赛汀耐药形成机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 赫赛汀(美国Genentech公司);Notch-1羊抗人多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);Notch-1^{IC}兔抗人多克隆抗体(美国Millipore公司);HER-2兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG、羊抗兔IgG(美国Santa Cruz公司);Protein G Agarose(碧云天生物技术研究所以)。

1.1.2 细胞株及培养条件 乳腺癌SK-BR3细胞购自上海细胞生物研究所、MDA-MB-231细胞由本室提供。SK-BR3、MDA-MB-231细胞分别常规培养于含10%胎牛血清、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM和RPMI1640培养基中,置于37℃、5%CO₂及饱和湿度孵箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学法检测细胞中Notch-1蛋白表

达 采用超敏二步法,按试剂盒说明进行SK-BR3、MDA-MB-231细胞Notch-1蛋白免疫细胞化学染色。以PBS缓冲液作为空白对照。Notch-1多克隆抗体的工作浓度1:150,孵育条件为4℃过夜。

1.2.2 Western blot法检测细胞中Notch-1^{IC}、HER-2蛋白表达 常规提取SK-BR3各处理组细胞和MDA-MB-231细胞总蛋白。采用BCA法检测蛋白浓度。行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭4h,分别加入兔抗人HER-2多克隆抗体、兔抗人Notch-1^{IC}多克隆抗体,4℃过夜,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:2 000稀释),室温孵育1h,ECL显色。用 β -actin作为目的蛋白参照。采用Bio-Rad图像分析系统照像,Quantity One软件分析灰度值。

1.2.3 RT-PCR法检测细胞中HES-1 mRNA表达水平 采用Trizol法提取细胞总RNA。测定RNA浓度和纯度后,按逆转录试剂盒说明书取1 μ g总RNA行逆转录反应。产物cDNA用于后续PCR反应。HES-1上游引物:5'-AAA TGA CAG TGA AGC ACC TCC G-3',下游引物:5'-GAA GCC TCC AAA CAC CTT AGC C-3',扩增产物413bp;GAPDH上游引物:5'-CGA CAG TCA GCC GCA TCT TCT T-3',下游引物:5'-CAT GAG TCC TTC CAC GAT ACC AA-3',扩增产物为582 bp。取扩增产物5 μ L行1.5%琼脂糖凝胶电泳,用Bio-Rad图像分析系统照像,Quantity One软件分析扩增条带产物的含量,以目的条带灰度值/GAPDH条带灰度值表示。

1.2.4 免疫共沉淀检测Notch-1与HER-2之间的相互关系 常规提取SK-BR3细胞总蛋白,取300 μ L蛋白样品,加入20 μ L充分重悬的Protein G Agarose,4℃缓慢摇动1h以去除非特异性结合,2 500 r/min离心5 min,收集上清。用BCA法测定蛋白浓度。按1 μ g抗体/100 μ g总蛋白分别加入Notch-1、HER-2多克隆抗体,同时以正常牛血清设置对照组。4℃缓慢摇动过夜。次日加入40 μ L充分重悬的Protein G Agarose,4℃缓慢摇动2h,2 500 r/min离心5 min,去除上清。用细胞裂解液洗涤沉淀5次,加入1 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液,沸水处理8min。行Western blot法检测。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS 17.0统计软件进行处理,采用两独立样本均数的t检验、多样本均数比较的方差分析和多重比较的SNK-q检验进行比较,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学法比较SK-BR3、MDA-MB-231

中Notch-1蛋白的表达

结果显示,Notch-1蛋白在SK-BR3、MDA-MB-231细胞的胞质和胞膜上均有表达,差异无统计学意义,Notch-1蛋白的活性分子Notch-1^{IC}核定位差异明显,在MDA-MB-231中显著增多,见图1。

2.2 Western blot 法检测 SK-BR3、MDA-MB-231 中 Notch-1^{IC} 与 HER-2 蛋白的表达

图2示,Notch-1^{IC}蛋白在MDA-MB-231细胞中的表达量(1.148 ± 0.084)是SK-BR3细胞(0.506 ± 0.016)的2.27倍,差异有统计学意义($P < 0.01$);HER-2蛋白在SK-BR3中的表达量(0.0798 ± 0.0086)是MDA-MB-231细胞(0.002 ± 0.0001)的39.9倍,有显著性差异($P < 0.01$),见图2。

2.3 赫赛汀对 SK-BR3 细胞中 Notch-1^{IC}、HER-2 蛋白表达的影响

结果显示,赫赛汀作用SK-BR3后,处理组与未

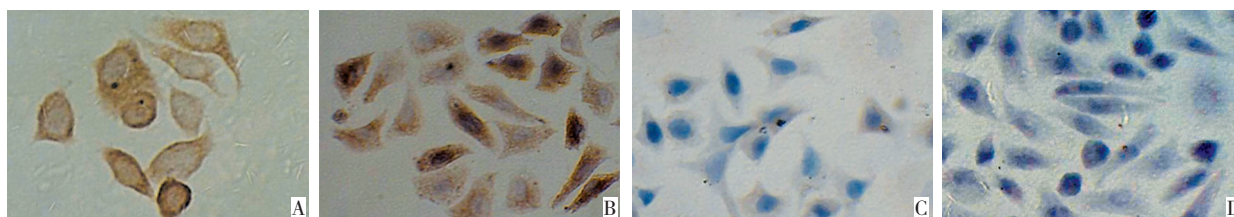
处理组比较Notch-1^{IC}蛋白的相对灰度值差异有统计学意义($P < 0.01$),处理组之间比较48h组与72h组无显著性差异($P > 0.05$),HER-2蛋白在处理组与未处理组之间比较无显著性差异($P > 0.05$),见图3。

2.4 赫赛汀对 SK-BR3 细胞 HES-1 mRNA 的影响

结果显示,赫赛汀作用SK-BR3后,处理组与未处理组HES-1 mRNA的相对灰度值比较差异明显($P < 0.01$),其中HES-1的24h、48h、72h组mRNA表达无显著性差异($P > 0.05$),见图4。

2.5 免疫共沉淀检测 SK-BR3 中 Notch-1 与 HER-2 的关系

在SK-BR3细胞中共表达的HER-2和Notch-1能够被Notch-1或HER-2抗体沉淀,以HER-2或Notch-1抗体进行Western blot检测,可检测到二者有相互作用,见图5。



A:SK-BR3细胞;B:MDA-MB-231细胞;C:SK-BR3细胞对照;D:MDA-MB-231细胞对照

图1 SK-BR3、MDA-MB-231中Notch-1蛋白的表达(HE×400)

Figure 1 Expression of Notch-1 protein in SK-BR3 and MDA-231 cells

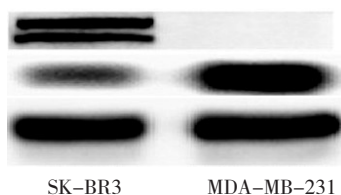


图2 SK-BR3与MDA-MB-231细胞中HER-2、Notch-1^{IC}蛋白的表达

Figure 2 Expression of HER2 and Notch-1^{IC} proteins in SK-BR3 and MDA-MB-231 cells

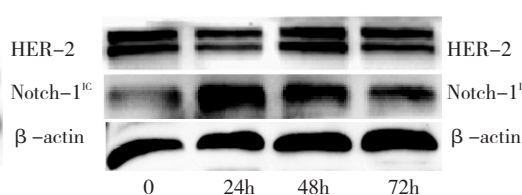


图3 赫赛汀作用SK-BR3细胞不同时间Notch-1^{IC}、HER-2蛋白的表达

Figure 3 Expression of Notch-1^{IC} and HER2 in SK-BR3 cells treated with herceptin

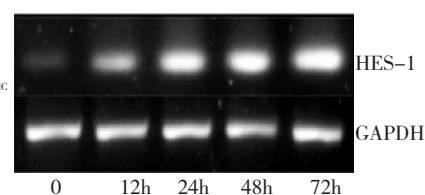
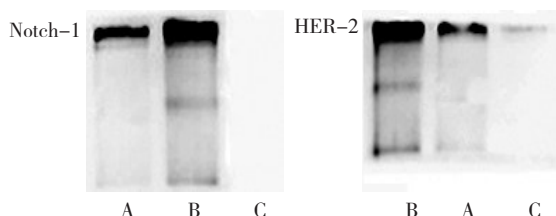


图4 赫赛汀作用SK-BR3细胞不同时间HES-1 mRNA的表达

Figure 4 Expression of HES-1 mRNA in SK-BR3 cells treated with herceptin



A:用Notch-1抗体沉淀;B:用HER-2抗体沉淀;C:正常牛血清

图5 SK-BR3细胞中Notch-1与HER2的免疫共沉淀

Figure 5 Co-immunoprecipitates of HER2 and Notch-1 in SK-BR3 cells

3 讨论

赫赛汀在临床上用于治疗HER-2过表达的乳腺癌患者,取得了较好的治疗效果。然而,临床上有近50%的患者对该药物敏感性较低,最初使用该药时即产生了耐药,并且多数患者在1年之内发生耐药现象^[3]。目前,对于赫赛汀的耐药机制还知之甚少。以往的研究发现,赫赛汀的耐药机制主要与PI3K/AKT信号通路、PTEN、IGF-1R、HSP27及MUC4等有关^[6]。其中,IGF-1R可与HER-2形成异源二聚体,活化PI3K/AKT和MAPK信号通路,抵抗赫赛汀的细胞毒

性作用;MUC4是一种膜相关糖蛋白,可与HER-2胞外段结合,一方面促进HER-2磷酸化,另一方面通过空间占位效应影响赫赛汀与HER-2的结合,降低肿瘤细胞对赫赛汀的敏感性;HSP27可增加HER-2的稳定性,降低赫赛汀引起HER-2蛋白的内吞与降解作用。可见,赫赛汀的耐药机制可能与众多信号分子有关,其中对HER-2的空间占位效应是其重要的作用方式,由此着手寻找赫赛汀耐药的关键分子靶点具有重要的意义。

Notch受体是一组高度保守的跨膜蛋白,与胚胎的发育、细胞的增殖、分化及凋亡密切相关。Notch受体与肿瘤的关系最早在T-ALL中发现,随后又在乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、肺癌及头颈部肿瘤中得到证实^[7]。乳腺癌与Notch的关系由鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)诱导乳腺肿瘤的动物模型中得到认识^[8]。MMTV可插入到Notch-1基因中,致其突变而引发肿瘤。研究表明Notch-1在低分化乳腺癌中表达量较高^[9],可作为乳腺癌预测的指标之一。目前认为Notch-1信号通路在乳腺癌中的促癌作用,主要是通过与其他信号通路之间的相互作用得以实现,具有代表意义的有关通路是Ras/MAPK、TGF- β 、VEGF及HER-2等^[10]。Chen等^[11]研究发现Notch-1^{IC}与CSL的复合体可结合于HER-2的启动子上,启动后者的转录,增加HER-2蛋白的表达,而HER-2又可以抑制Notch-1的活性^[12]。据报道^[12]赫赛汀可降低HER-2对Notch-1的抑制作用,使Notch-1活性恢复,具体机制有待探讨。

本研究证实,在HER-2过表达细胞中的Notch-1的活化水平明显低于HER-2非过表达的细胞,显示可能存在HER-2抑制Notch-1活性。由于Notch-1的胞外段有若干个重复的EGF样结构,推测HER-2是否通过EGFR结构与Notch-1结合,占据Notch-1受体与配体结合位点,而降低Notch-1的活性,免疫共沉淀法结果支持这种关系的存在。实验选用20 $\mu\text{g/mL}$ 的赫赛汀(患者体内的最低血药浓度^[13])处理SK-BR3后发现,细胞内Notch-1^{IC}的蛋白表达水平升高,24 h时达最高水平,48 h稳定表达,HES-1 mRNA水平与Notch-1^{IC}呈一致升高趋势。HER-2的表达量在赫赛汀处理前后未发生明显变化,可能与活化的Notch-1启动HER-2的转录,增加HER-2蛋白的表达有关。以上结果显示赫赛汀能增强Notch-1蛋白的活性、活化Notch-1信号通路,由此可产生促癌效应,干扰赫赛汀的抑瘤作用,提示Notch-1信号可能与乳腺癌形成赫赛汀耐药有关。

综上所述,在HER-2过表达的乳腺癌细胞中,Notch-1可与HER-2形成复合体,减少Notch-1配体与受体之间的结合,降低Notch-1^{IC}的蛋白水平,而赫赛汀作为HER-2的特异性单克隆抗体,可与Notch-1竞争HER-2的结合位点,同时释放出Notch-1,进而活化Notch-1通路。上调的Notch-1可通过RAS、cyclinD、NF- κ B等多种途径影响到肿瘤细胞的增殖与凋亡。Notch-1信号通路的活化可能是乳腺癌细胞形成赫赛汀耐药的重要基础。

参考文献

- 1 Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2): 177-184.
- 2 付强,于世英.HER2和ER/PR双阳性表达的I~III期乳腺癌患者生存分析[J].*中国肿瘤临床*,2009,36(18):1051-1053.
- 3 Bartsch R, De Vries C, Pluschnig U, et al. Predicting for activity of second-line trastuzumab-based therapy in her2-positive advanced breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(1): 367.
- 4 Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A Notch-1 updated[J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(5): 621-629.
- 5 Shi W, Harris AL. Notch signaling in breast cancer and tumor angiogenesis: cross-talk and therapeutic potentials[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2006, 11(1): 41-52.
- 6 Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(6):977-984.
- 7 Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5): 690-701.
- 8 Callahan R, Smith GH. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways[J]. *Oncogene*, 2000, 19(8): 992-1001.
- 9 Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8530-8537.
- 10 Wu F, Stutzman A, Mo YY. Notch signaling and its role in breast cancer[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 4370-4383.
- 11 Chen Y, Fischer WH, Gill GN. Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJkappa and NOTCH[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22): 14110-14114.
- 12 Osipo C, Patel P, Rizzo P, et al. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor[J]. *Oncogene*, 2008, 27(37): 5019-5032.
- 13 Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (Herceptin)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase(PI-3K) and epidermal growth factor receptor(EGFR) kinase inhibitors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(2): 187-201.

(2010-10-19收稿)

(2011-02-08修回)

(周晓颖校对)