

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1566- 03

过量表达 ErbB2 促进 MCF- 7 细胞 体外生长和侵袭*

彭宝岗, 何 强, 梁力建

(中山大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510089)

[摘 要] 目的: 研究过量表达 ErbB2 对于 MCF- 7 细胞生长和侵袭的作用。方法: 构建带有 ErbB2 逆转录病毒, 感染 MCF- 7 细胞, 检测 ErbB2 的表达。用转染后的细胞开展体外生长和侵袭实验。结果: 转染后 ErbB2 在 MCF- 7 细胞中过量表达。体外生长和侵袭实验显示, 过量表达 ErbB2 的细胞增殖快、侵袭性强。结论: 过量表达 ErbB2 促进 MCF- 7 细胞的生长和侵袭; 阻断 ErbB2 信号可能为高表达 ErbB2 的肿瘤治疗带来新的策略。

[关键词] 基因, ErbB2; MCF- 7 细胞; 细胞分裂; 侵袭

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Overexpression of ErbB2 promotes growth and invasion in MCF- 7 cells *in vitro*

PENG Bao- gang, HE Qiang, LIANG Li- jian

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat- sen University, Guangzhou 510089, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of ErbB2 overexpression on growth and invasiveness in cultured MCF- 7 cell line. **METHODS:** Retrovirus containing ErbB2 gene was transfected into MCF- 7 cells and ErbB2 expression was detected by Western blotting. Proliferation and invasive assays were carried out. Cells overexpressed ErbB2 and its control, AP2, were used in the experiment. **RESULTS:** ErbB2 was overexpressed in MCF- 7 cells after transfection. *In vitro*, cells overexpressed ErbB2 showed highly proliferated and highly invasive characteristics compared to the control cells. **CONCLUSION:** Overexpression of ErbB2 promotes cell proliferation and enhances invasiveness in MCF- 7 cells. Inhibition of signaling induced by ErbB2 might be a novel strategy for the therapeutics of cancer with ErbB2 overexpression.

[KEY WORDS] Genes, ErbB2; MCF- 7 cells; Cell division; Invasiveness

许多人体肿瘤中 ErbB2 过量表达, 如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌和宫颈癌等。ErbB2 过量表达往往预后差, 提示 ErbB2 的异常表达与肿瘤发生发展之间的关系^[1- 4]。然而, ErbB2 在肿瘤的发生、发展过程中的地位和作用仍然需要进一步阐明。本研究通过在乳腺癌细胞 MCF- 7 中过量表达 ErbB2, 观察 ErbB2 能否促进细胞的生长和侵袭, 以探讨 ErbB2 与肿瘤发展之间的关系。

材 料 和 方 法

1 细胞株、细胞培养液和试剂

野生型 MCF- 7 (MCF- 7 WT) 细胞培养于含有

10% 胎牛血清的 RPMI- 1640 培养液中。Anti- ErbB2 (Ab- 3, clone 3B5) 购自 Oncogene。

2 逆转录病毒生产和细胞转染

AP2 逆转录病毒, pJ6bleo 质粒以及 293GPG 逆转录病毒包装细胞由 Dr. Jacques Galipeau 提供。pLXSN- ErbB- 2 由 Drs. David J. Riese II 赠送。按以前所报道的方法产生 AP2- ErbB2 逆转录病毒^[5]。于 24 孔培养板中每孔植入 2×10^4 个细胞, 加入 50 μ L 浓缩的 AP2- ErbB2 逆转录病毒, 连续感染 3 d。

3 Western blotting 检测

细胞长至 70% 汇合度, 4 $^{\circ}$ C PBS 液洗 2 次。加入改良 RIPA 裂解液裂解细胞。裂解液含有 50

[收稿日期] 2005- 02- 08 [修回日期] 2005- 03- 23

* [基金项目] 广东省科技推广基金资助 (No. 2004B20501001)

Tel: 020- 87755766- 8214; E- mail: pengbaogang@ 163. net

mmol/L HEPES (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、0.5% NP-40、1 mmol/L sodium fluoride、0.5% sodium deoxycholate、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、10 mg/L aprotinin 和 10 mg/L leupeptin。细胞提取物在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 30 min, 将上清装入预冷的 Eppendorf 管中。取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 并将蛋白转至硝酸纤维膜。5% 无脂牛奶常温下封闭 1 h, 1:500 抗-ErbB2 抗体 4 °C 下孵育 4 h, 用 TBST 液漂洗 2 遍。加入 II 抗 (1:3 000), 室温下孵育 40 min, TBST 液漂洗 3 遍, 显影, 曝光。

4 细胞增殖分析

细胞长至 70% 汇合度, 用蛋白酶消化, 使用 96 孔细胞培养皿, 每孔植入 1×10^3 个细胞, 连续培养 72 h。每孔加入 50 μL 50% 的 TCA, 4 °C 下放置 1 h, 以固定蛋白。用水清洗 5 遍, 常温下晾干 1 h。加入 100 μL 0.2% SRB (溶于 1% 醋酸) 染色 1 h。用 1% 醋酸清洗 5 遍, 干燥 1 h。每孔加入 150 μL 10 mmol/L Tris (pH 10.5), 轻微摇晃 5 min, 在 530 nm 波长下读取 A 值。实验重复 3 遍, 结果用均数 ± 标准差表示。

5 细胞侵袭实验

使用涂有 Matrigel 的 8 μm 多孔单元系统。细胞在无血清培养液中饥饿 12 h, 将 3×10^4 的细胞置于单元的上部 (上部含有 300 μL 无血清的 RPMI, 0.2% BSA, 下部含有 400 μL 2% 血清的 RPMI, 0.2% BSA), 单元置于 24 孔培养皿中培养 48 h。48 h 后, 位于上层的无侵袭的细胞用棉签擦除, 位于底层的侵袭性细胞用 3% 的甲醛固定、染色并计数。实验重复 3 次, 结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结 果

1 ErbB2 在 MCF-7 中过量表达

Western blotting 显示, 野生型 MCF-7 中有低水平的内源性 ErbB2 表达。细胞经转导后, 外源性导入的 ErbB2 在 MCF-7 中呈现过量表达。AP2 是载体, 其 ErbB2 表达水平与野生型 MCF-7 相似 (图 1)。

2 过量表达 ErbB2 促进细胞增殖

为观察 ErbB2 对细胞增殖的影响, 我们比较 MCF-7 ErbB2 和 MCF-7 AP2 两种细胞的增殖率。结果显示, MCF-7 ErbB2 组的 A 值为 0.648 ± 0.016 , MCF-7 AP2 的 A 值为 0.298 ± 0.033 , MCF-7 ErbB2 的增殖率明显高于 MCF-7 AP2 ($P < 0.05$) (图 2)。

3 过量表达 ErbB2 促进细胞侵袭

为观察过量表达 ErbB2 对细胞侵袭性的影响, 我们对 MCF-7 ErbB2 和 MCF-7 AP2 两种细胞体外侵袭力进行了比较。结果显示, MCF-7 ErbB2 的细胞数为 51.889 ± 15.407 , MCF-7 AP2 的细胞数为 11.778 ± 4.116 , MCF-7 ErbB2 的侵袭力明显强于 MCF-7 AP2 ($P < 0.05$) (图 3)。

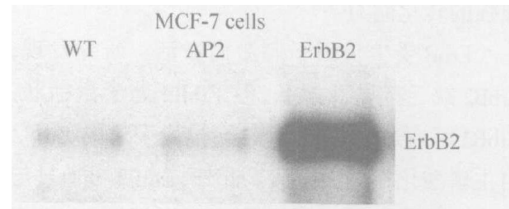


Fig 1 ErbB2 was overexpressed in MCF-7 wild type following transfection. ErbB2 was detected with anti-ErbB2 antibody (Western blotting).

图 1 转染后 ErbB2 在野生型 MCF-7 (MCF-7 wild type, WT) 中过量表达

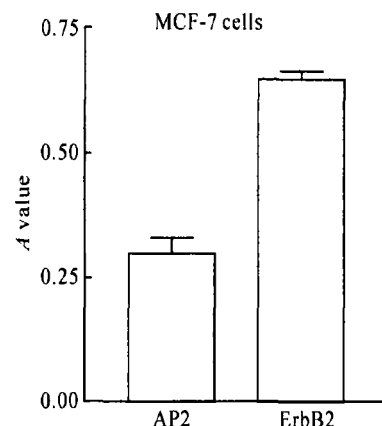


Fig 2 Overexpression of ErbB2 promotes cell proliferation in MCF-7 cells.

图 2 过量表达 ErbB2 促进 MCF-7 细胞的增殖

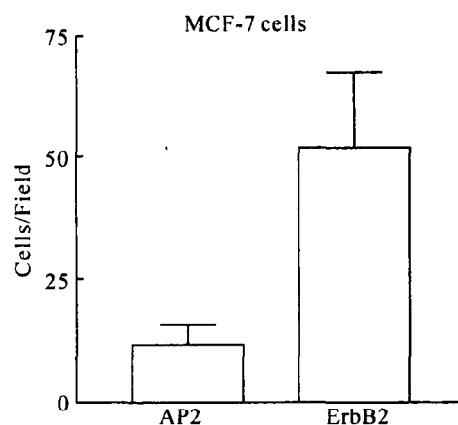


Fig 3 Overexpression of ErbB2 promotes cell invasiveness in MCF-7.

图 3 过量表达 ErbB2 促进 MCF-7 细胞侵袭性

讨 论

[参 考 文 献]

细胞的生长、分化受多种信号的调控^[6,7],其中,来自 ErbB2 的信号更是起着关键的作用。ErbB2 属于受体-酪氨酸激酶家族。自 20 年前首次发现 ErbB1,随后陆续发现 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 等,其意义最为重要的是 ErbB 的致癌性,尤其是 ErbB2 具有很强的转化能力^[8]。

ErbB 受生长因子刺激而激活。研究发现,虽然 ErbB2 缺乏特异性配基,但 ErbB2 处于激活状态^[9]。ErbB2 可通过 2 种方式激活:过量表达的 ErbB2 可因自主磷酸化作用而激活。此外,ErbB2 可通过与 ErbB 家族其它成员形成异二聚体而激活。ErbB2 激活引发胞浆内酪氨酸位点的磷酸化反应,制造出信号分子的接纳点,进而调节细胞内一系列分子信号事件,包括细胞增殖和分化等。

过量表达 ErbB2 促进细胞的增殖和侵袭,这与 ErbB2 有着很强的促有丝分裂和转化能力有关。过量表达 ErbB2 可以延长 MAPK 活性,后者可促进细胞的分裂和增殖。因此,ErbB2 的表达失控与许多人体肿瘤的发生、发展有着高度的相关性。过量表达 ErbB2 对 MCF-7 细胞体外增殖和侵袭具有明显促进作用,提示 ErbB2 对于肿瘤细胞生长和侵袭具有重要的调控作用。对于过量表达 ErbB2 的人体肿瘤,干预和阻断 ErbB2 分子信号转导是一种有效的治疗策略。

- [1] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer[J]. *Science*, 1989, 244(4905): 707-712.
- [2] Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility[J]. *Adv Cancer Res*, 2000, 78(1): 31-101.
- [3] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127-137.
- [4] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer[J]. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3159-3167.
- [5] Galipeau J, Li H, Paquin A, et al. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 2384-2394.
- [6] 宋朋红,谢海洋,郑树森,等. 蛋白酶体抑制剂对 T 淋巴细胞增殖活化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(3): 533-536.
- [7] 雷燕,高倩,林燕林,等. rhIFN- α 和 rhIL-2 对血管内皮细胞调控的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(2): 234-237.
- [8] Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions[J]. *EMBO J*, 1996, 15(10): 2452-2467.
- [9] Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, et al. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3[J]. *EMBO J*, 1995, 14(17): 4267-4275.