

Jab1 在乳腺癌细胞中对曲妥珠单抗敏感性的影响

沈倩¹, 刘勇², 于世英¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科, 武汉 430030; 2. 东南大学医学院附属徐州医院/徐州市中心医院肿瘤科, 徐州 210000)

摘要 **目的** 探讨 Jab1 在 HER2 过表达乳腺癌中对曲妥珠单抗治疗敏感性的影响。**方法** 收集使用曲妥珠单抗治疗的 26 例 HER2 过表达乳腺癌患者的标本, 其中曲妥珠单抗敏感组 14 例, 耐药组 12 例, 应用实时荧光定量聚合酶链反应 (q-PCR) 检测乳腺癌组织标本中 Jab1 的表达。运用 Western blotting 方法检测人乳腺癌细胞系 BT474 及曲妥珠单抗耐药乳腺癌细胞系 C5 和 C6 中 Jab1 的表达; 通过 siRNA 干扰技术敲除 Jab1 后, 检测 C5 及 C6 细胞对曲妥珠单抗治疗敏感性的变化, 以及对曲妥珠单抗诱导的凋亡作用的影响。**结果** 与曲妥珠单抗敏感的乳腺癌患者比较, Jab1 在曲妥珠单抗耐药的乳腺癌患者中表达水平显著增高 ($P < 0.05$); 在曲妥珠单抗耐药细胞株中 C5 和 C6 中, Jab1 的蛋白表达水平显著高于药物敏感株; 敲除 Jab1 后, 耐药株可重获对曲妥珠单抗的敏感性, 由曲妥珠单抗诱导的凋亡作用显著增强, 在 C5 细胞系中, $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 曲妥珠单抗处理 24 h 后, Jab1 敲低组与对照组凋亡率分别为 $(12.8 \pm 2.9)\%$ 和 $(2.7 \pm 0.5)\%$ ($P < 0.05$); 在 C6 细胞系中, Jab1 敲低组与对照组的凋亡率分别为 $(18.8 \pm 3.6)\%$ 和 $(4.1 \pm 1.1)\%$ ($P < 0.05$)。**结论** Jab1 表达上调导致 HER2 过表达乳腺癌细胞对曲妥珠单抗治疗敏感性下降, 敲除 Jab1 后有望逆转耐药。

关键词 Jab1; 曲妥珠单抗; 耐药性; 乳腺癌; 人类表皮因子受体 2

中图分类号 R979.1; R969

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2019)01-0014-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.01.003

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Effect of Jab1 on Trastuzumab Treatment Sensitivity in Breast Cancer Cell

SHEN Qian¹, LIU Yong², YU Shiyang¹ (1. Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Oncology, Xuzhou Central Hospital, School of Medicine, Southeast University, Xuzhou 210000, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Jab1 on trastuzumab (Ttzm) treatment sensitivity in HER2 positive breast cancer. **Methods** q-PCR was performed to detect the expression of Jab1 in 26 HER2 positive breast cancer patient with Ttzm treatment 14 patients were sensitive to Ttzm, while 12 patients were Ttzm-resistant. The expression of Jab1 was examined by Western blotting in Ttzm-sensitive and resistant breast cancer cell lines. With the knockdown of Jab1 by siRNA, the sensitivity to the drug and the Ttzm-induced apoptosis were measured in related cell lines. **Results** The expression of Jab1 in Ttzm resistant breast cancer patient was significantly higher than these Ttzm sensitive patient ($P < 0.05$). In Ttzm-sensitive breast cancer cell line C5 and C6, the expression of Jab1 was significantly lower than that in the Ttzm-resistant cells. After knockdown of Jab1 in Ttzm-resistant cells, C5 and C6 cells were re-sensitive to the Ttzm treatment, and the Ttzm-induced apoptosis was observed to be more obvious. In C5 cell line, after 24 hours of Ttzm treatment, the apoptotic rates in Jab1 knockdown group and the control group were $(12.8 \pm 2.9)\%$ and $(2.7 \pm 0.5)\%$ ($P < 0.05$), while in the C6 cell line, the apoptotic rates were $(18.8 \pm 3.6)\%$ and $(4.1 \pm 1.1)\%$ ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** Up-regulated expression of Jab1 is associated with the reduction of Ttzm treatment sensitivity in breast cancer cells. Knockdown of Jab1 might be a potential mechanism to antagonize the Ttzm-resistance.

KEY WORDS Jab1; Trastuzumab; Drug resistance; Breast cancer; Human epidermal growth factor receptor-2

乳腺癌是危害女性生命的最常见肿瘤, 近年来发

病率不断上升。人类表皮因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 是一个重要的原癌基因, 编码具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体样蛋白^[1]。HER2 基因扩增导致肿瘤细胞表面 HER2 蛋白表达增加, 从而使 HER2 受体活化^[2]。在原发性乳腺癌患者中有 25%~30% 患者 HER2 过度表达^[3]。目前研究表明, HER2 是重要的乳腺癌预后判断因子, HER2 过表达与乳腺癌侵袭转移密切相关, 而且往往提示乳腺癌患者预后不佳^[4]。曲妥珠单抗 (trastuzumab) 是一种人源化单克隆抗体, 靶向作用于 HER2 受体, 致使肿瘤细胞在 G1 阶段的生长终止, 可以有效地抑制 HER2 过

收稿日期 2017-11-24 修回日期 2018-01-10

作者简介 沈倩 (1983-), 女, 江苏徐州人, 主治医师, 博士, 研究方向为肿瘤化疗、放疗及分子靶向治疗。ORCID: 0000-0002-4097-6775。电话: 027-83663408, E-mail: shenqianoncology@163.com。

通信作者 刘勇 (1970-), 男, 山东聊城人, 主任医师, 博士, 从事肿瘤内科工作。电话: 0516-83956565, E-mail: lyly.7011@163.com。

通信作者 于世英 (1955-), 女, 四川人, 教授, 主任医师, 博士, 从事肿瘤内科工作。电话: 027-83663676, E-mail: syu@tjh.tjmu.edu.cn。

表达肿瘤细胞的增殖,是 HER2 过表达乳腺癌的最有效靶向治疗方式^[5]。尽管如此,对曲妥珠单抗的原发或继发耐药现象仍是临床上乳腺癌治疗的一大难题^[6-8]。目前研究显示, Jab1/CSN5 (Jun activating binding protein) 作为 COP9 信号体的第 5 个亚单位,在乳腺癌、卵巢癌、肝癌、头颈部肿瘤等实体肿瘤中发挥重要作用。笔者检测正常组织和乳腺癌组织中 Jab1 表达水平,分析其与临床病理特征的相关性,利用小干扰 RNA (siRNA) 技术敲除乳腺癌细胞中 Jab1,观察 Jab1 对于导致 HER2 过表达乳腺癌对曲妥珠单抗治疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人正常乳腺组织和乳腺癌组织标本来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科。人乳腺癌细胞 (BT474、C5、C6) 由华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心实验室保存。达尔伯克改良伊格培养基 (DMEM/G) 及 RPMI 1640 培养基购自 Hyclone; 胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,曲妥珠单抗 (Ttzm, 赫赛汀, Roche 公司), RIPA 裂解液、Lipofectamine™ 3000 脂质体 (Invitrogen 公司), 抗体 Jab1 及二抗 (Santa Cruz 公司); Jab1 siRNA 由 Ambion 公司合成。

1.2 细胞培养和 Jab1 siRNA 转染 BT474 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM/G 培养基; 人曲妥珠单抗耐药乳腺癌细胞系 C5、C6 培养于含有 10% 胎牛血清及 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 曲妥珠单抗的 DMEM/G 培养基常规培养。根据 Lipofectamine™ 2000 说明书,将 BT474 和 SKBR3 以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种 6 孔板,每个细胞系分为两组: ①转染空白 siRNA 的对照组; ②转染 Jab1 siRNA 的实验组,每组分别使用 100 pmol siRNA 转染细胞 6 h 后,换新鲜培养基培养 48 h,收集细胞进行相应实验。

1.3 3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氨基苯基)-2-(4-磺苯基-2H-四唑) (MTS) 实验检测曲妥珠单抗在乳腺癌细胞系中对细胞增殖的影响 MTS 实验分为两部分,第一部分验证乳腺癌细胞系 BT474 及曲妥珠耐药株 C5 和 C6 的药物敏感性;第二部分检测 Jab1 敲低后, C5 和 C6 耐药株对曲妥珠单抗敏感性的影响,每个细胞系分为两组: siNC 空白组及 Jab1 siRNA 组,依据“1.2”项中实验步骤转染 24 h 后,用不同梯度浓度的曲妥珠单抗处理细胞。两部分实验的药物处理时间均为 72 h,药物梯度为 12.5, 25, 50, 100, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药物处理完毕后,用 MTS 法检测每孔中的细胞活性,计算并制作曲妥珠单抗的生长抑制曲线,并计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,消化计数后,将耐药株 C5 和 C6 细胞以细胞密度为 $2.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于直径 6 cm 的细胞培养皿中,每个细胞系的实验分组如下: ①空载体 siRNA + 二甲亚砜 (DMSO) 组; ②空载体 siRNA + 曲妥珠单抗组; ③Jab1 siRNA + DMSO 组; ④Jab1 siRNA + 曲妥珠单抗组。第 2 天细胞贴壁后,依照“1.2”项所述,行细胞转染,24 h 后,依分组加入 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 曲妥珠单抗或对应体积的 DMSO,处理 24 h 后,收集每组中含有上清液里细胞的全部细胞, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,吸弃上清液,加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬漂洗细胞,再次以 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,吸弃上清液 PBS,加入凋亡抗体反应缓冲液 100 μL , 然后加入 Annexin V 5 μL , 于室温下避光反应 5~10 min,于上机前加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 400 μL ,用流式细胞仪检测每组中的凋亡细胞比例,其中 Annexin V 阳性/PI 阴性的细胞为早期凋亡细胞, Annexin V 阳性/PI 阳性的细胞则为晚期凋亡细胞,统计这两部分细胞在整体细胞中的比例作为该组的凋亡率。

1.5 定量聚合酶链反应 (q-PCR) 实验检测乳腺癌组织标本中 Jab1 表达 按流程提取 RNA,并逆转为 cDNA,在 PCR 仪上完成 q-PCR,实验条件:变性温度为 95°C ,退火温度为 55°C , Jab1 引物序列如下: F: 5'-GCAATCGGGTGGTATCATAGC-3'; R: 5'-TGCGGATA-TTGTTCTTGTGGA-3',完成 PCR 取得每个标本 CT 值后,取曲妥珠单抗敏感中 1 例乳腺癌组织当做对照组,其 Jab1 表达记为 1,依照公式:其他组织表达量倍数 = $2^{-\Delta\text{Ct}}$,其中 ΔCt = 其他组织 CT 值 - 对照组 CT 值,计算完毕后,使用 Graphpad Prism 5.0 制图,并计算两组间 Jab1 表达量的差异。

1.6 Western blotting 检测 Jab1 水平 RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每个样本取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳,转印至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜,用 5% 脱脂乳封闭 1 h, 4°C 一抗孵育过夜 (Jab1 1 : 1000、 β -actin 1 : 1000)。磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 洗涤 $3 \times 10 \text{ min}$,室温二抗孵育 1 h (1 : 3000)。PBST 洗涤 $3 \times 10 \text{ min}$,增强型化学发光试剂 (ECL) 法显色后显影成像,以 β -actin 作为内参。

1.7 统计学方法 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有实验均重复 3 次,组间差异通过 student-*t* 检验统计两组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Jab1 在曲妥珠单抗耐药及敏感乳腺癌组织中的

表达 26 例使用曲妥珠单抗治疗的乳腺癌患者组织 q-PCR 结果显示,在曲妥珠单抗耐药的乳腺癌组织中 Jab1 的表达水平显著高于敏感的乳腺癌组织(图 1),耐药组中 Jab1 表达的平均值为敏感组的 2.1 倍($t = 3.564, P < 0.01$)。

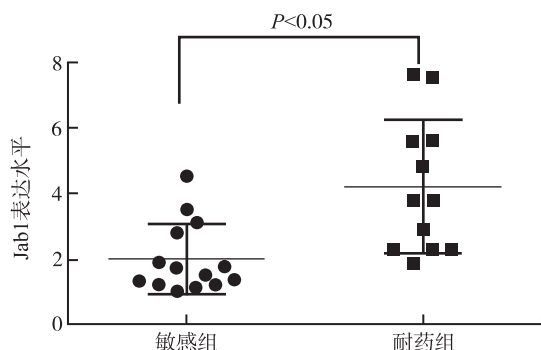


图 1 Jab1 在乳腺癌患者中表达情况

Fig.1 Jab1 expression in breast cancer patients

2.2 Jab1 在乳腺癌细胞株中的表达 Western blotting 检测结果显示 Jab1 在曲妥珠单抗耐药株乳腺癌细胞 C5、C6 中的表达水平显著高于曲妥珠单抗敏感乳腺癌细胞系 BT474(图 2),灰度值分析显示,C5 和 C6 细胞系中 Jab1 在蛋白水平的表达分别是 BT474 细胞的 18.3 和 15.1 倍。

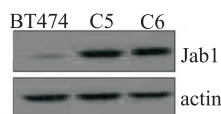


图 2 Jab1 在乳腺癌细胞系中的表达

Fig.2 Jab1 expression in breast cancer cell lines

2.3 Jab1 敲除对曲妥珠单抗耐药性的影响 Western blotting 检测结果显示,Jab1 siRNA 能够显著降低 C5 及 C6 细胞系中 Jab1 的表达(图 3),灰度值分析显示 C5 细胞系中,Jab1 siRNA 组中 Jab1 的表达为对照组的 23.5%,而 C6 细胞系中,Jab1 siRNA 组为对照组的 45.6%。MTS 结果显示,Jab1 敲除后对曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞株系 C5 和 C6 重新对曲妥珠单抗敏感($P < 0.05$)(图 4)。

2.4 Jab1 敲除对曲妥珠单抗治疗诱导的凋亡的影响 Annexin V/PI 染色结果显示,在 Jab1 敲除后的细胞系 C5 和 C6,曲妥珠单抗导致的凋亡作用显著增强,在 C5 细胞系中,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 曲妥珠单抗处理 24 h 后,Jab1 敲除组与对照组凋亡率为 $(12.8 \pm 2.9)\%$ 和

$(2.7 \pm 0.5)\%$ ($P < 0.05$)(图 5)。而在 C6 细胞系中,Jab1 敲除组与对照组的凋亡率分别为 $(18.8 \pm 3.6)\%$ 和 $(4.1 \pm 1.1)\%$ ($P < 0.05$)(图 6)。

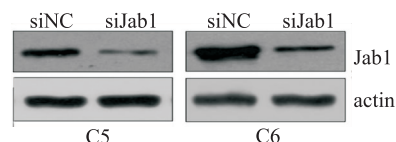


图 3 敲除后 Jab1 在 C5 和 C6 中的表达

Fig.3 Jab1 expression in C5 cells and C6 cells after Jab1 knockdown

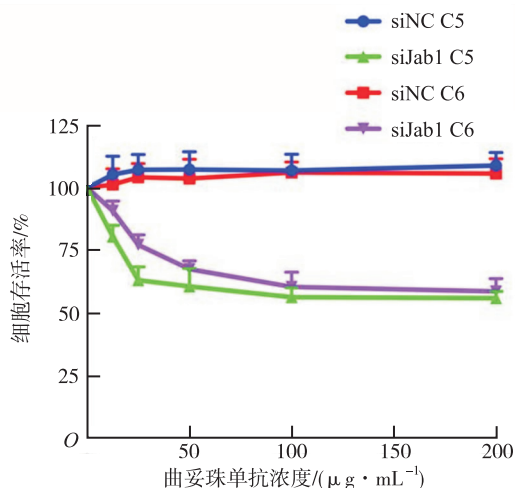


图 4 Jab1 敲除后对 C5 和 C6 细胞存活率的影响

Fig.4 Viability of C5 cells and C6 cells after Jab1 knockdown

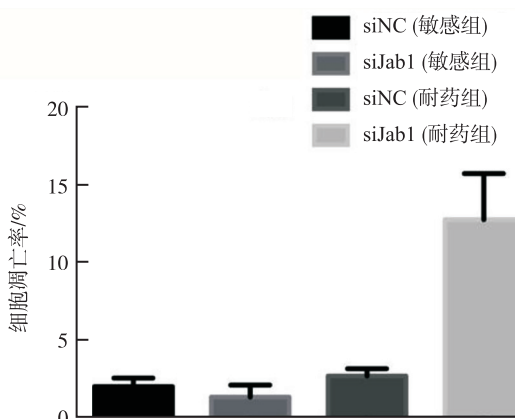


图 5 Jab1 敲除后对 C5 细胞凋亡的影响

Fig.5 Apoptosis rate of C5 cells after Jab1 knockdown

3 讨论

HER2 是乳腺癌重要的预后判断因子,目前以

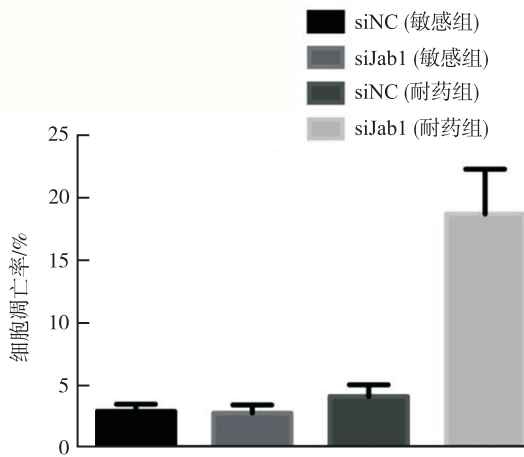


图 6 Jab1 敲除后对 C6 细胞凋亡的影响

Fig.6 Apoptosis rate of C6 cells after Jab1 knockdown

HER2 为靶点药物曲妥珠单抗在大部分 HER2 阳性的乳腺癌患者中取得了良好的疗效,改善了预后,但是在治疗过程中大部分患者发生了曲妥珠单抗耐药的情况,这也是目前乳腺癌治疗研究中的热点与难点。在乳腺癌中,HER2 的过表达能够激活一些重要的信号通路,如 MAPK 及 PI3K/AKT 信号通路等,这些重要信号通路的激活能够促进肿瘤的增殖及侵袭。基于此现象,通过抑制这些重要通路来逆转曲妥珠单抗耐药取得了进展,动物实验及前期临床试验表明,以这些信号通路为靶点的药物联合曲妥珠单抗在 HER2 乳腺癌治疗中取得了一定疗效,但对 HER2 过表达乳腺癌曲妥珠单抗耐药的进一步研究仍然是必要的。Jab1/C5N5 是 COP9 信号体的第 5 个亚单位,在许多恶性肿瘤组织中过表达的现象,包括乳腺癌、胃癌、结直肠癌、胶质瘤等,实验表明, Jab1 对这些肿瘤的增殖及侵袭性有显著影响,因此 Jab1 在很多肿瘤中认为是一个潜在的治疗靶点,此外,HER2 能够在转录水平激活 Jab1 从而在诸多肿瘤发生发展中发挥重要作用^[9]。在乳腺中,HER2 是重要的治疗靶点,HER2 和 Jab1 的联系使得笔者做了大胆的假设,并研究 Jab1 在曲妥珠单抗耐药中是否发挥一定的作用。本研究结果显示, Jab1 在曲妥珠单抗耐药乳腺癌患者组织中表达显著高于曲妥珠单抗敏感乳腺癌患者,同样的,在曲妥珠单抗耐药的乳腺癌细胞株 C5 和 C6 中, Jab1 蛋白表达水平显著

高于敏感组细胞株。这提示 Jab1 可能作为预测 HER2 过表达乳腺癌对于曲妥珠单抗治疗敏感性的有效预测指标。进一步利用 RNA 干扰技术敲除耐药细胞株中 Jab1 的表达,可见细胞株 IC₅₀ 明显下降。凋亡实验显示, Jab1 敲除后增强了曲妥珠单抗诱导的凋亡作用。本研究结果提示,在乳腺癌中, Jab1 过表达可能诱导其发生对曲妥珠单抗治疗耐药,虽然这一现象的具体机制需要进一步的研究,但是本研究对临床上逆转乳腺癌治疗中的曲妥珠单抗耐药提供了新的思路。

参考文献

- [1] DI COSIMO S, BASELGA J. Management of breast cancer with target agents: importance of heterogeneity [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(3): 139-147.
- [2] YARDEN Y, PINES G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 553-563.
- [3] LI C I, URIBE D J, DALING J R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 93(8): 1046-1052.
- [4] SLAMON D J, LEYL B, JONES S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 [J]. N Engl J Med, 2001, 344(11): 783-792.
- [5] YEON C H, PEGRAM M D. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer [J]. Inv New Drugs, 2005, 23(3): 391-409.
- [6] ARTEAGA C L, SLIWKOWSKI M X, OSBORNE C K, et al. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(1): 16-32.
- [7] THUY V U, SLIWKOWSKI M X, CLARET F X. Personalized drug combinations to overcome trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 10(3): 353-365.
- [8] MARIA L C, PAULA G T, YOLANDA F P, et al. Mechanisms behind the resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer and strategies to overcome it [J]. Clin Med Ins: Oncol, 2016, 10(Suppl 1): 21-30.
- [9] HSU M C, CHANG H C, HUNG W C. HER-2/neu transcriptionally activates Jab1 expression via the AKT/beta-catenin pathway in breast cancer cells [J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(3): 655-667.