

雷公藤红素促进人类乳腺癌 MDA-MB-453 细胞 HER2 蛋白降解及诱导凋亡的机制

闫燕艳^{1*}, 符立梧²

(1.山西大同大学医学院药理教研室,山西 大同 037009;2.华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心,广东 广州 510060)

摘要:【目的】研究雷公藤红素促进人类乳腺癌 MDA-MB-453 细胞 HER2 蛋白降解及诱导凋亡的机制。【方法】MTT 法检测雷公藤红素对 MDA-MB-453 的细胞毒作用;Hoechst 33258 染色荧光显微镜观察细胞凋亡形态学改变;PI 单染流式细胞术检测细胞凋亡率;Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白变化;免疫荧光检测 HER2 蛋白在细胞中的定位变化。【结果】雷公藤红素对 MDA-MB-453 有强大的细胞毒作用,IC₅₀ 为(5.22 ± 0.29) μmol/L;该化合物可浓度依赖性地诱导 MDA-MB-453 细胞发生凋亡,出现典型的凋亡小体、sub-G1 改变及细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、Parp 的裂解活化。值得一提的是,雷公藤红素作用后,Western Blot 检测到 HER2 蛋白明显降低,并且原先主要表达在细胞膜上的 HER2 蛋白发生了异位。【结论】雷公藤红素浓度依赖性地诱导 MDA-MB-453 细胞发生凋亡,并且促进 HER2 蛋白降解,这可能与改变了 HER2 蛋白在细胞中的定位有关系。

关键词: 雷公藤红素;HER2;细胞凋亡;蛋白异位

中图分类号: R73-36+1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)04-0471-05

Celastrol Degrades HER2 Protein and Induces Cell Apoptosis in MDA-MB-453 Cells

YAN Yan-yan^{1*}, FU Li-wu²

(1. Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037009, China; 2. State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To investigate the mechanism of celastrol degrading HER2 protein and inducing cell apoptosis in MDA-MB-453 cells.【Methods】The cytotoxicity of celastrol to MDA-MB-453 cells was measured by MTT assay. Apoptotic morphology was observed after Hoechst 33258 staining. Sub-G1 DNA peak was analyzed by flow cytometry to quantify the degree of apoptosis. Changes of apoptotic related proteins were analyzed by Western blot. Subcellular distribution of HER2 was observed under fluorescence microscopy by immunofluorescence assay.【Results】Celastrol exhibited potent cytotoxicity in HER2-overexpressing MDA-MB-453 cells, and IC₅₀ was (5.22 ± 0.29) μmol/L. After MDA-MB-453 cells were treated with different concentrations of celastrol for 24 h, typical apoptotic bodies, increasing sub-G1 DNA peak and activation of Caspase-3 and Parp were detected in a dose-dependent manner. It was noteworthy that immunofluorescence study with anti-HER2 antibody showed that celastrol disturbed the subcellular distribution of HER2, with decreased location in the plasma membrane.【Conclusion】Celastrol induced MDA-MB-453 cancer cells apoptosis in a dose-dependent manner. Subcellular redistribution of HER2 maybe involved in HER2 protein degradation by celastrol.

Key words: celastrol; HER2; apoptosis; subcellular redistribution

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):471-475]

收稿日期:2011-11-28

基金项目:山西大同大学博士科研启动项目(2010-16-1)

作者简介:闫燕艳,*通信作者,博士,讲师,研究方向:肿瘤药理学;E-mail:sanyan523@yahoo.com.cn

HER2 受体是 EGFR 受体家族成员中的第 2 号,在许多上皮肿瘤,尤其是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和鼻咽癌中过度表达^[1]。HER2 受体已成为一个抗肿瘤新靶标。抗体 Herceptin 以及小分子酪氨酸激酶抑制剂 Lapatinib 已经被美国 FDA 批准在临床应用,对 HER2 过表达的肿瘤具有很好的治疗效果。但生物大分子如抗体 Herceptin 具有渗透性差、给药不方便和费用高等不利因素。因此寻找针对 HER2 的小分子药物更具有意义。雷公藤红素(Celastrol),又名南蛇藤素(图 1A),是存在于卫矛科植物雷公藤、南蛇藤等中的抗癌活性成分。近来多项研究也表明^[2-5],该化合物可以抑制多种肿瘤细胞株生长,诱导其凋亡,还可通过阻断肿瘤新生血管生成的许多信号通路来抑制肿瘤的侵袭转移。本研究观察雷公藤红素促进人类乳腺癌 MDA-MB-453 细胞 HER2 蛋白降解及诱导凋亡的机制,这将为开发成为新型抗 HER2 过表达肿瘤药物以及寻找其他抗 HER2 肿瘤药物提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与细胞培养

HER2 过表达的人类乳腺癌 MDA-MB-453 细胞株为中科院细胞库提供,用含有 100 mL/L 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液。细胞在 37 °C 和体积分数 5% CO₂ 的实验条件下培养。

1.2 药品、主要试剂

雷公藤红素(图 1)购自广州兴达生物科技有限公司,纯度 98%以上,将其溶于 DMSO 配成 40 mmol/L 的母液,临用前用含有 100 mL/L 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度。RPMI1640 培养基及胎牛血清购自 GIBCO 公司,HER2、Caspase-3、Parp 抗体及增强 PhototopeTM-HRP 化学发光试剂盒购自 Cell Signaling 公司,GAPDH 抗体及二抗 IgG-HRP 购自上海康成生物公司,Prestained Protein Marker 购自 Fermentas (MBI) 公司,MTT、Hochest 33258、抗兔 IgG-FITC、PI 及 RNAase 购自 Sigma 公司,PVDF 膜购自 Milipore 公司。其他常用试剂均购自广州威佳科技有限公司。

1.3 流式细胞仪检测 DNA 含量

收集经雷公藤红素处理后的 MDA-MB-453 细胞各 6×10^5 个,用冰 PBS 洗两次,加入预冰冷的 700 mL/L 乙醇固定 8 h, PBS 洗后重悬于含 100 $\mu\text{g/mL}$ RNAase 及 50 $\mu\text{g/mL}$ PI 的 0.5 mL 染色液中,4 °C 避光染 30 min 后流式检测,LYSIS 软件分析 DNA 的含量,计算凋亡细胞的百分比^[6]。

1.4 Western Blot 检测蛋白的表达

在 8% ~ 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,每孔加入 50 ~ 100 μg 蛋白样品,80 ~ 180 V 电泳分离蛋白;80 V 转印 2 ~ 3 h;室温封闭 2 h;特异性一抗封闭 4 °C 过夜,TBST 洗 3 次;二抗 IgG-HRP 反应 1 h 或 4 °C 过夜;TBST 洗 3 次;经增强 PhototopeTM-HRP 化学发光试剂反应 30 s,暗室压片后,自动 X-光胶片机冲洗胶片^[5,7]。

1.5 免疫荧光检测 HER2 在细胞中定位

取对数生长期 MDA-MB-453 细胞接种于 6 孔板中(孔板中铺有 NUNC 玻片),贴壁后加入 8.00 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素,作用 24 h 后,取出玻片,PBS 洗 2 次,用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min,并加入 0.1% Triton X-100 10 min,PBS 洗 3 次。在室温下封闭 1 h 后加入一抗 HER2,在室温下孵育 2 h,PBS 洗 3 次,然后在闭光下加入标记 FITC 的兔二抗,室温下孵育 1 h,PBS 洗 3 次,DAPI 染核,90% 的甘油封片,在荧光显微镜下随机观察 N 个视野($\times 400$)并拍照^[8]。

2 结 果

2.1 雷公藤红素诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡

体外 MTT 实验表明雷公藤红素对 MDA-MB-453 细胞表现出强大的细胞毒作用,IC₅₀ 值为 $(5.22 \pm 0.29) \mu\text{mol/L}$ (图 1B),提示该化合物可能具有潜在的抗 HER2 的作用。雷公藤红素作用 24 h 后,MDA-MB-453 细胞出现细胞凋亡的典型变化,细胞核固缩、边集,有的断裂成大小不一的圆形颗粒,呈现亮蓝色浓染的块状或颗粒状荧光,而对照组细胞核形规则,呈弥散均匀的淡蓝色荧光(图 2)。PI 单染流式结果显示在雷公藤红素作用下,MDA-MB-453 细胞凋亡的比例(sub-G1 峰)分别为 $(2.63 \pm 0.67)\%$ (DMSO 对照), $(5.20 \pm 0.17)\%$

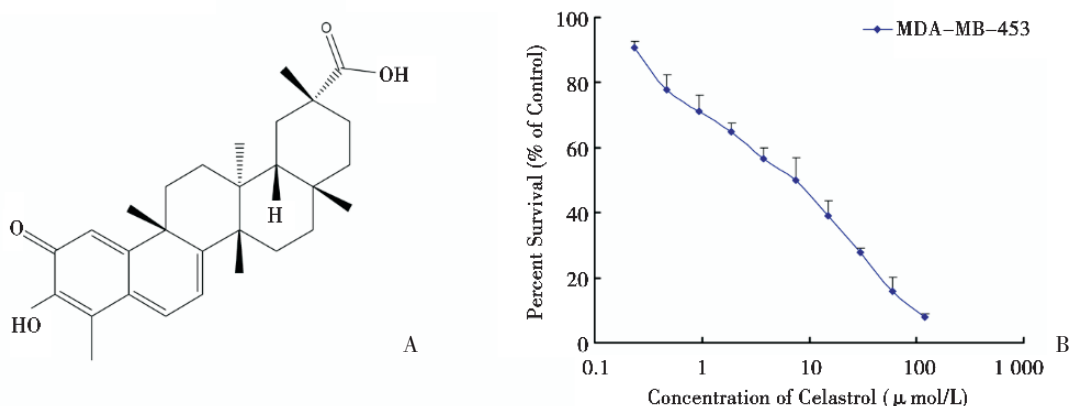


图1 雷公藤红素结构式(A)和对 MDA-MB-453 的细胞毒作用(B)

Fig.1 The chemical structure of celastrol (A) potent cytotoxicity to HER2 -overexpressing MDA-MB-453 cells (B)

Cytotoxicity was measured by MTT assay. The cells having grown for 24 h were exposed to a full range of concentrations of celastrol for 72 h. Cell viability was assessed by model 550 microplate reader after staining with MTT for 4 h. Means \pm SD of six determinations. Each experiment was done in 3 replicate wells. IC₅₀ MDA-MB-453 = 5.22 \pm 0.29 $\mu\text{mol/L}$.

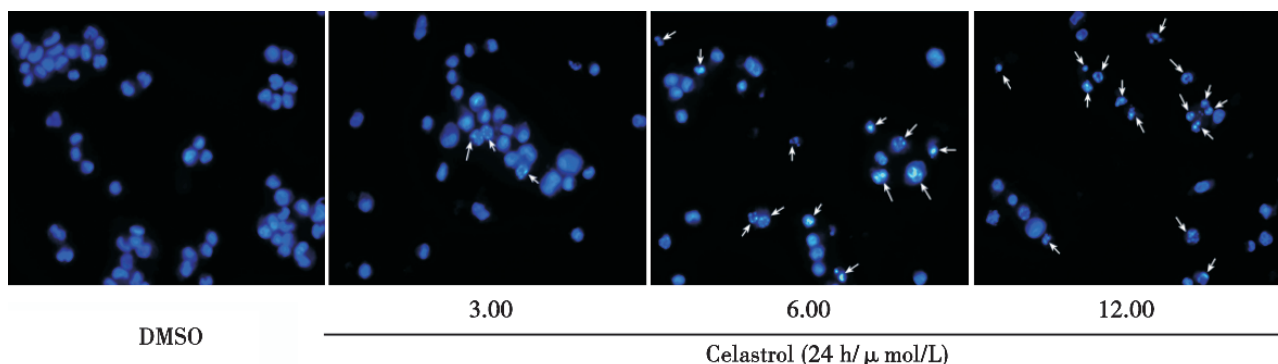


图2 雷公藤红素诱导 MDA-MB-453 细胞凋亡形态学改变

Fig.2 Celastrol-mediated cell apoptosis morphologic changes

MDA-MB-453 cells were treated with 3.00 to 12.00 $\mu\text{mol/L}$ celastrol for 24 h. The apoptotic cells detected by Hoechst 33258 staining and observed under fluorescence microscope at $\times 400$ magnification displayed condensed and fragmented nuclei, shrinkage of cell volume in a concentration dependent manner.

(3.00 $\mu\text{mol/L}$), (22.77 \pm 4.06)% (6.00 $\mu\text{mol/L}$), (42.43 \pm 5.01)% (12.00 $\mu\text{mol/L}$, 图 3)。Western blot 结果显示细胞凋亡的经典指标 Caspase-3 及 Parp 均出现了明显地裂解活化(图 4)。上述实验结果均表明, 雷公藤红素能够浓度依赖性地诱导 MDA-MB-453 细胞发生凋亡。

2.2 雷公藤红素促进 MDA-MB-453 细胞 HER2 蛋白降解及其在细胞中发生异位

雷公藤红素处理 MDA-MB-453 细胞 24 h 后, Western blot 结果显示 HER2 蛋白表达浓度依赖性降低(图 4)。我们通过免疫荧光方法进一步观察

到 MDA-MB-453 经 8.00 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素作用 24 h 后 HER2 蛋白在细胞中发生了异位。表现为对照组 HER2 蛋白大多数在细胞膜上均匀地表达, 加药后 HER2 蛋白从细胞膜异位到胞浆或胞核, 呈斑点状荧光(图 5)。这些结果表明雷公藤红素促进 HER2 蛋白降解可能与改变了 HER2 蛋白在细胞中的定位有关系。

3 讨论

研究表明, HER2 过表达可导致化疗耐受及不

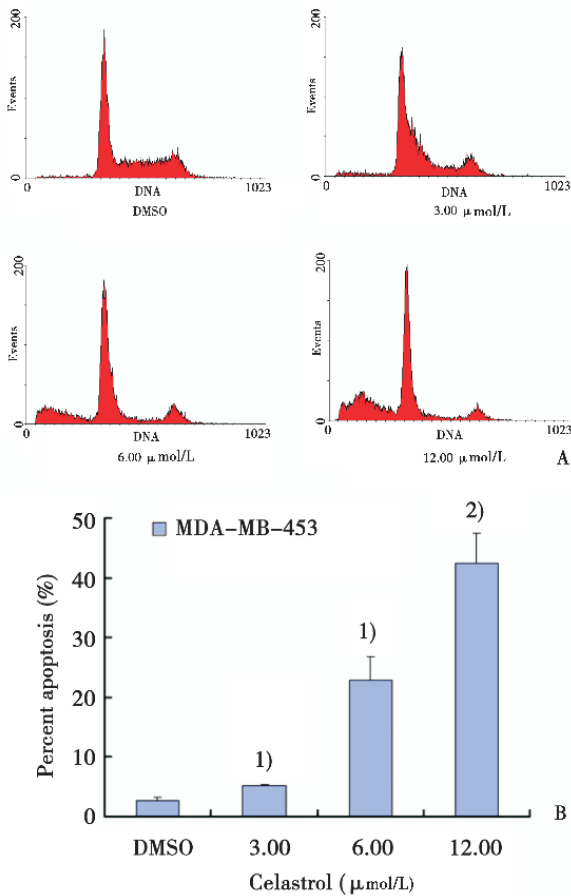


图 3 PI 单染流式检测雷公藤红素诱导 MDA-MB-453 细胞的凋亡率

Fig.3 The apoptotic rate of MDA-MB-453 cells induced by celastrol were tested by PI staining flow cytometry

A: After MDA-MB-453 cells were treated with different concentrations of celastrol for 24 h, sub-G1 peak were observed by PI staining flow cytometry. B: Statistical analysis of percent apoptosis. (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$, versus DMSO control, $n = 3$

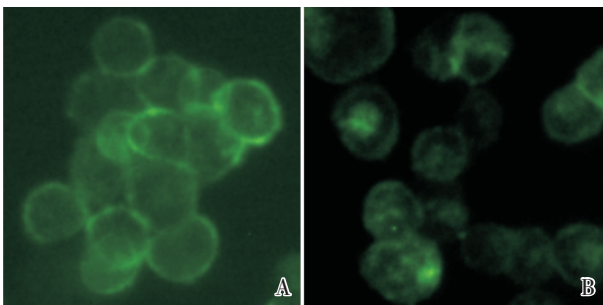


图 5 雷公藤红素改变 HER2 蛋白在细胞中的分布

Fig.5 Changes in subcellular distribution of HER2 was observed under fluorescence microscopy (× 400)

A: DMSO, B: 8.00 μmol/L celastrol, After MDA-MB-453 cells grown on coverslips were treated with 8.00 μmol/L celastrol or DMSO for 24 h, immunofluorescence assay was performed according to the Experimental Section.

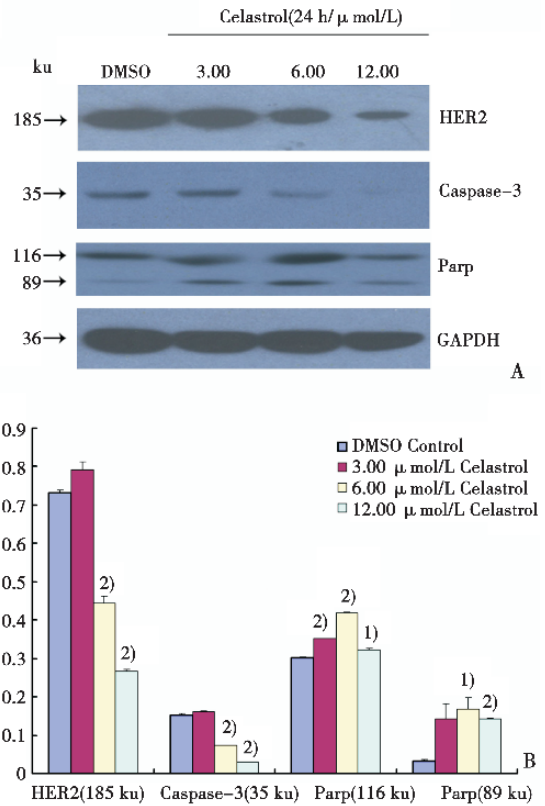


图 4 Western blot 检测凋亡相关蛋白及 HER2 蛋白改变
Fig.4 The expression of apoptotic related proteins and HER2 were detected by Western blot analysis

A: Activations of Caspase-3 and the cleavage of PARP in dose-dependent manner were observed. Additionally, celastrol could down-regulate the expression of HER2 protein. B: Statistical analysis of relative protein level. (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$, versus DMSO control, $n = 3$) Bandscan software was used to quantify the density of each protein band. The relative protein level was calculated from a ratio of the density relative to GAPDH.

良预后。近来多项研究表明,雷公藤红素可抑制多种肿瘤细胞株生长,诱导其凋亡。本研究发现,雷公藤红素对 HER2 过表达人乳腺癌 MDA-MB-453 细胞表现出强的细胞毒作用,IC50 值为 $(5.22 \pm 0.29) \mu\text{mol/L}$, 提示该化合物可能具有潜在的抗 HER2 作用。本文将重点探讨雷公藤红素促进 MDA-MB-453 细胞 HER2 蛋白降解及诱导凋亡的机制,这将为 HER2 过表达肿瘤治疗提供新的实验依据。Kaufmann 等^[9]用依托泊苷治疗肿瘤后,肿瘤细胞出现 PARP 水解及 DNA 断裂,随后研究表明这是 Caspases 激活的结果,人们开始认识到化疗药物可通过诱导细胞凋亡而杀伤肿瘤细胞。那

么,雷公藤红素对HER2过表达的MDA-MB-453的细胞毒作用是否与诱导细胞凋亡有关呢?本实验结果显示,MDA-MB-453细胞经3.00、6.00、12.00 $\mu\text{mol/L}$ 的雷公藤红素作用24 h后,Hoechst 33258染色、PI单染及Western Blot结果均显示该化合物可浓度依赖性地诱导MDA-MB-453细胞发生凋亡(图2~4)。人类乳腺癌MDA-MB-453是HER2过表达的细胞株。通过化学合成的siRNA干扰HER2后可见两种细胞生长受到明显的抑制^[8],提示HER2对MDA-MB-453细胞的生长至关重要。我们的研究发现,经0、3.00、6.00、12.00 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素作用于MDA-MB-453细胞24 h后,HER2蛋白表达浓度依赖性降低(图4)。为了探讨雷公藤红素降低HER2蛋白表达的机制,我们通过免疫荧光进一步观察HER2蛋白在细胞中的定位是否发生变化。结果显示,MDA-MB-453细胞经8.00 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素作用24 h后,HER2蛋白发生了异位(图5)。这些结果表明雷公藤红素促进HER2蛋白降解可能与改变它在细胞中的定位有关系。我们将在后续研究中继续深入雷公藤红素促进HER2蛋白降解的机制,这将为新型抗HER2过表达肿瘤药物的研发提供先导化合物及理论依据。

参考文献:

- [1] Slamon DJ, Clark GM. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? [J]. *Science*, 1988, 240 (4860): 1795-1798.
- [2] Pang X, Yi Z, Zhang J, et al. Celastrol suppresses angiogenesis-mediated tumor growth through inhibition of AKT/mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (5): 1951-1959.
- [3] Sung B, Park B, Yadav VR, et al. Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors [J]. *J Bio Chem*, 2010, 285 (15): 11498-11507.
- [4] Zhu H, Liu XW, Cai TY, et al. Celastrol acts as a potent antimetastatic agent targeting beta1 integrin and inhibiting cell-extracellular matrix adhesion, in part via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(2): 489-499.
- [5] Wang XN, Wu Q, Yang X, et al. Effects of Celastrol on growth inhibition of U937 leukemia cells through the regulation of the Notch1/NF-kappaB signaling pathway in vitro [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(4): 385-390.
- [6] Way TD, Kao MC, Lin JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. *J Bio Chem*, 2004, 279 (6): 4479-4489.
- [7] Yan Y, Su X, Liang Y, et al. Emodin azide methyl anthraquinone derivative triggers mitochondrial-dependent cell apoptosis involving in caspase-8-mediated Bid cleavage [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7 (6): 1688-1697.
- [8] Yan YY, Zheng LS, Zhang X, et al. Blockade of Her2/neu binding to Hsp90 by emodin azide methyl anthraquinone derivative induces proteasomal degradation of Her2/neu [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8 (5): 1687-1697.
- [9] Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, et al. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(17): 3976-3985.

(编辑 徐杰)