

## 抑制葡萄糖调节蛋白 78 表达对阿霉素诱导人乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡的增敏作用

刘宏莉, 龚萍, 刘浩, 张旭东, 蒋志文

**[摘要]** **目的:** 探讨特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 对阿霉素 (adriamycin, ADR) 诱导人乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡的影响, 以期为乳腺癌化疗提供新的靶点。 **方法:** 培养人乳腺癌 SK-BR-3 细胞, 用 ADR (1 mg/L) 处理人乳腺癌 SK-BR-3 细胞 0、6、12、24、36 h, Western blot 检测 GRP78 的表达; ADR 处理 SK-BR-3 细胞 48 h 后, 用溴化丙啶染色测定细胞凋亡率; 用小分子干扰 RNA siRNA 预处理 SK-BR-3 细胞, 再予 ADR 同上处理, 检测细胞凋亡率, 比较 siRNA 作用前后细胞凋亡率的变化。 **结果:** ADR 可诱导内质网应激, 上调 GRP78 的表达, SK-BR-3 细胞对 ADR 诱导的细胞凋亡率 < 30%; siRNA 可明显阻断 GRP78 的表达, 显著增加 ADR 诱导的细胞凋亡作用, 凋亡率达到 (62.30 ± 0.88)% ( $P < 0.01$ )。 **结论:** 抑制 GRP78 的表达可增强人乳腺癌 SK-BR-3 细胞对 ADR 经内质网应激途径诱导细胞凋亡的敏感性, 促进肿瘤细胞的凋亡, 增强其抗肿瘤作用。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 葡萄糖调节蛋白 78; SK-BR-3 细胞株; 细胞凋亡; RNA, 小分子干扰

**[中国图书资料分类法分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A

### Inhibition of glucose regulated protein 78 in sensitizing adriamycin-induced apoptosis of human breast cancer cells

LIU Hong-li, GONG Ping, LIU Hao, ZHANG Xu-dong, JIANG Zhi-wen

(Department of Pharmacy, Bengbu Medical College,

Anhui Engineering Technology Research Center of Biochemical Pharmaceuticals, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of down-regulating glucose regulated protein 78 (GRP 78) on adriamycin (ADR) induced apoptosis in human breast cancer cell line SK-BR-3, and to provide a new target for chemotherapy of breast cancer. **Methods:** Human breast cancer cell line SK-BR-3 cells were cultured, and treated with ADR (1 mg/L) for 0, 6, 12, 24, and 36 hours; the expression of GRP78 at different time points was measured by Western blot. After treated with ADR for 48 hours, SK-BR-3 cells were harvest and stained with propidium iodide for apoptotic assay. SK-BR-3 cells were pretreated with siRNA, and the same was done to ADR; cell apoptosis was measured to compare the effect of GRP78 on ADR induced apoptosis in SK-BR-3. **Results:** ADR induced ER stress and up-regulated the expression of GRP78. ADR induced less than 30% cell apoptosis in SK-BR-3 cells. siRNA significantly blocked the expression of GRP78 and increased the apoptosis induced by ADR. The apoptosis rate was (62.30 ± 0.88)% ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions:** Inhibition of the expression of GRP78 in human breast cancer cells SK-BR-3 can increase the sensitivity of ADR-induced apoptosis through ER pathway, which may promote the apoptosis of tumor cells and enhance the anti-tumor effect.

**[Key words]** breast cancer; SK-BR-3 cell line; glucose regulated protein 78; apoptosis; RNA, small interfering

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 又称免疫球蛋白重链结合蛋白 (the immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip), 是细胞为了适应内质网应激状态所产生的一类应激蛋白, 与热休克蛋白 70 (Hsp70) 家族有较高的同源性, 被认为是 Hsp70 家族的成员之一<sup>[1]</sup>。GRP78 不仅

是一种内质网驻留性质蛋白质, 定位于内质网膜起分子伴侣的作用, 参与蛋白质的折叠和转运, 它还是一种应激蛋白, 在葡萄糖饥饿、低氧、缺钙等应激状态下大量表达以维持内质网的稳定, 保护细胞。随着研究的不断深入, 学者们发现 GRP78 还可以转运至细胞膜、细胞质, 甚至分泌到细胞外, 参与细胞分化、细胞生存、血管形成、肿瘤的发生、抗肿瘤免疫等重要的生物学过程的调控, 是一种多功能蛋白质<sup>[2]</sup>。近年来研究<sup>[3]</sup>表明, GRP78 在某些肿瘤中呈高表达并随恶性程度的增高而增高, 对于肿瘤细胞抗化疗药物的性质及抗原表达有重要意义。本实验以 GRP78 为靶点, 通过小分子干扰 (siRNA) 技术特异性下调人乳腺癌 SK-BR-3 细胞中 GRP78 的表达, 观察干扰前后阿霉素 (adriamycin, ADR) 引起 SK-BR-3 细胞凋亡的变化, 探讨乳腺癌细胞对化疗药物

[收稿日期] 2009-12-30

[基金项目] 安徽省人才开发基金资助项目 (2002Z023); 安徽省自然科学基金资助项目 (090413135); 安徽省高等学校优秀青年人才基金资助项目 (2009SQZRZ134ZD)

[作者单位] 蚌埠医学院 药理学系, 安徽省生代药物工程技术研究中心, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘宏莉 (1971 - ), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 蒋志文, 博士, 研究生导师, 教授, 研究方向: 肿瘤药理学。

的耐药性与 GPR78 表达的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌 SK-BR-3 细胞: 我院生化药理研究室冻存培养。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; ADR 购自浙江海正药业股份有限公司; 兔抗人 GRP78 抗体、鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司; 山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; siGENOME SMART pool、siGENOME SMART pool GRP78 (M-008198-01) 及对照 siRNA pool (D-001206-13-20) 购自 Dharmacon 公司; Opti-MEM 培养基和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SK-BR-3 细胞在 DMEM 高糖型培养基中 (含 10% 的灭活小牛血清, 20 mmol/L HEPES, 2.0 g/L 碳酸氢钠,  $1 \times 10^5$  IU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 10 mg/L 庆大霉素, 0.6 mg/L 胰岛素, 37.0 °C、95% 空气、5% CO<sub>2</sub> 温湿环境下 (CO<sub>2</sub> 培养箱) 培养传代。

1.2.2 实验步骤 (1) ADR 处理 SK-BR-3 细胞 0、6、12、24、36 h, 提取总蛋白定量后, Western blot 检测 GRP78 的表达。(2) ADR 处理乳腺癌 SK-BR-3 细胞, 48 h 后溴化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色检测细胞凋亡率。(3) siRNA 预处理 SK-BR-3 细胞后再给予 ADR 处理 48 h 后检测细胞凋亡率。比较 siRNA 作用前后各指标的变化。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达 收集稳定表达细胞用细胞裂解液 (总体积 200 ml: 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 20 ml, 1 mol/L NaCl 28 ml, 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 1 ml, 100 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 21 ml, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> 40 ml, Triton X-100 2 ml, 用前加入蛋白酶抑制剂 12  $\mu$ mol/L Leupenptin、1 mmol/L PMSF 各 2 ml/L) 冰上裂解 30 min, 提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量法 (参照试剂盒说明书操作) 测各组蛋白浓度, 用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度, 与 2 $\times$  上样缓冲液 1:1 混合, 100 °C 煮沸 5 min 蛋白变性。每组取蛋白 40  $\mu$ g, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 (70 V, 30 min, 100 V, 90 min); 转膜 (200 mA, 3 h) 至 PVDF 膜; 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h (或 4 °C 过夜); 一抗: 1/300, 室温孵育 2 h (或 4 °C 过夜); TPBS 洗涤 3 次, PBS 洗涤 1 次; 二抗: 1/5 000, 室温孵育 2 h; TPBS 洗涤 3 次, PBS 洗涤 1 次; ECL 发光试剂盒暗室发光、显影、定影。Bio-Rad 凝胶成像系

统获取图像。

1.2.4 PI 染色检测细胞凋亡 将对数生长期 SK-BR-3 细胞制成单细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板, 每孔  $1 \times 10^5$  个细胞, 培养 24 h 后加 ADR, 继续培养 48 h 后收集各孔培养液至对应流式管中, 用预冷 PBS 清洗每孔, 收集清洗液至对应培养液中, 1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清; 培养板中加入 PI 缓冲液 (5 mg PI、0.1 g 柠檬酸钠, 100  $\mu$ l Triton X-100, 100 ml dH<sub>2</sub>O) 750  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 10 min, 吹打收集细胞至对应流式管中, 轻轻摇动混匀。4 °C 避光保存, 过夜, 流式细胞仪检测具有亚 G<sub>1</sub> 期 DNA 含量的细胞比例, 代表凋亡细胞数。

1.2.5 siRNA 转染 (1) 将对数生长期细胞制成单细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板, 每孔  $5 \times 10^4$  个细胞, 培养 16~24 h 或待细胞生长达 50% 融合后进行细胞转染。用 1 $\times$  siRNA 缓冲液将 siRNA 稀释成 20  $\mu$ mol/L 的溶液, 按表 1 进行 siRNA 滴定, 然后室温放置 5 min。(2) Lipofectamine 2000 的稀释 (1:20): 1.25  $\mu$ l Lipo + 23.75  $\mu$ l Opti = 25  $\mu$ l, 室温放置 5 min 后与滴定好的 siRNA 以 1:1 混合, 室温放置 20 min。(3) 在步骤 (2) 等待的时间里将培养板里原先的培养液弃去, 每孔换上新鲜的 No-AB DMEM 250  $\mu$ l, 然后加入步骤 (3) 的混合液 50  $\mu$ l/孔。(4) 继续培养 6 h 或过夜, 更换培养液, 仍用 No-AB DMEM。(5) 继续培养 24 h 后给予药物处理 (用 No-AB DMEM 稀释药物), 同前进行其他实验操作。

表 1 siRNA 的滴定

	siRNA	Opti-MEM	Total
Control siRNA 100 nmol/L	1.5 $\mu$ l	23.5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
GRP78 siRNA 100 nmol/L	1.5 $\mu$ l	23.5 $\mu$ l	25 $\mu$ l

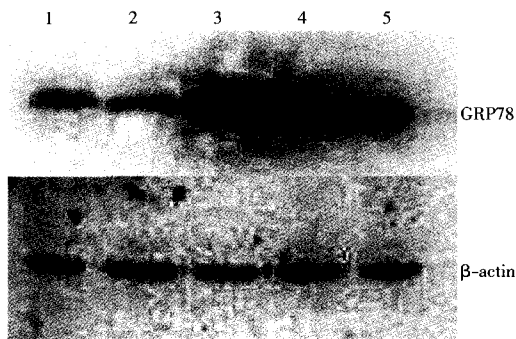
1.3 统计学方法 采用方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 SK-BR-3 细胞中 GRP78 的表达及对 ADR 诱导的反应 Western blot 检测结果可以看出, GRP78 在 SK-BR-3 细胞中呈阳性表达, 并且 ADR 可以上调其表达, ADR 作用 24 h 时 GRP78 表达最强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 至 36 h 时表达减弱 (见图 1、表 2)。

2.2 ADR 和 siRNA 转染对 SK-BR-3 细胞 GRP78 蛋白表达及凋亡的影响 ADR 对 SK-BR-3 细胞作用 48 h 后细胞凋亡率与对照组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。按照 siRNA 干扰技术操作步骤将

SK-BR-3 细胞进行 GRP78 siRNA 及 Contro siRNA 转染,24 h 后分别给予 ADR(1 mg/L)处理 48 h,收集细胞测细胞凋亡率;Western blot 检测转染率 Western blot 实验显示 GRP78 siRNA 及 Contro siRNA 转染效率,Control siRNA 转染后 GRP78 蛋白表达无明显影响,GRP78 siRNA 转染后 GRP78 蛋白表达显著下降(见图 2、表 3)。GRP78 siRNA 转染后给予 ADR 处理,细胞凋亡率明显升高,与阴性未给药组、Control siRNA 组、GRP78 siRNA 组及 Control siRNA + ADR 组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(见表 4)。



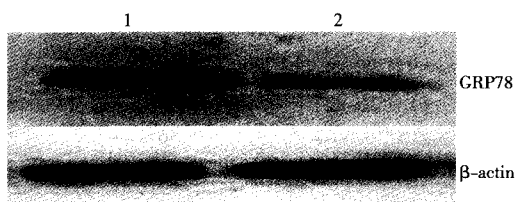
1~5 分别为 ADR 作用 SK-BR-3 细胞 0、6、12、24、36 h

图 1 ADR 上调 SK-BR-3 细胞 GRP78 的表达

表 2 ADR 作用后不同时间 GRP78 与  $\beta$ -actin 灰度值的比值比较( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

时间(h)	GRP78 与 $\beta$ -actin 灰度值的比值
0	1.661 2 $\pm$ 0.15
6	2.126 7 $\pm$ 0.26
12	13.954 8 $\pm$ 0.85 <sup>##</sup>
24	17.822 4 $\pm$ 1.86 <sup>##</sup>
36	15.773 4 $\pm$ 0.35 <sup>##</sup>
F	205.93
P	<0.01
MS <sub>组内</sub>	0.879

q 检验:与 0 h 比较<sup>##</sup> $P < 0.01$



1:Control siRNA;2:GRP78 siRNA

图 2 siRNA 转染对 GRP78 表达的影响

### 3 讨论

乳腺癌是一种严重威胁人类健康的疾病,其发病呈逐年上升趋势,化疗是除手术外另一种重要的

表 3 转染后 GRP78 与  $\beta$ -actin 灰度值的比值比较( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	GRP78 与 $\beta$ -actin 灰度值的比值	t	P
Control siRNA	0.851 2 $\pm$ 0.121	10.26	<0.01
GRP78 siRNA	0.126 3 $\pm$ 0.018		

表 4 各组细胞凋亡率比较( $n_i = 4; \bar{x} \pm s$ )

分组	细胞凋亡率(%)	F	P	MS <sub>组内</sub>
Control	4.345 $\pm$ 0.78	2 153.62	<0.01	0.738
ADR	23.850 $\pm$ 1.00 <sup>**</sup>			
Control siRNA	15.378 $\pm$ 1.00 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	2 153.62	<0.01	0.738
GRP78 siRNA	16.515 $\pm$ 0.84 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>			
Control siRNA + ADR	26.318 $\pm$ 0.58 <sup>**<math>\Delta\Delta</math> <math>\#\#\+</math></sup>	2 153.62	<0.01	0.738
GRP78 siRNA + ADR	62.300 $\pm$ 0.88 <sup>**<math>\Delta\Delta</math> <math>\#\#\+</math> <math>\circ</math></sup>			

q 检验:与 Control 组比较<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与 ADR 组比较 <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ;与 Control siRNA 组比较<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与 GRP78 siRNA 组比较<sup>+</sup> $P < 0.01$ ;与 Control siRNA + ADR 组比较 <sup>$\circ$</sup>  $P < 0.01$

治疗手段,而肿瘤细胞对化疗药物的不敏感性成为临床治疗的难点。近年来的研究<sup>[2-3]</sup>表明,内质网应激与细胞凋亡及肿瘤的发生、发展都密切相关。细胞应激时 GRP78 的高表达是细胞的一种防御机制,通过这种机制保护细胞,延长细胞在各种不利因素刺激下的生存期。肿瘤形成及实体肿瘤微环境的变化(葡萄糖饥饿、缺氧、酸中毒等),可作为诱导因素导致内质网应激,诱导 GRP78 的表达。Gazit 等<sup>[4]</sup>发现,与正常上皮细胞株相比,乳腺癌细胞株的 GRP78 蛋白质水平约高 1.5 ~ 3 倍。Fernandez 等<sup>[5]</sup>也通过对比研究证实,人类乳腺癌标本的 GRP78 表达显著高于癌旁组织。此外在上皮样细胞癌、结肠癌、肝癌中均发现有 GRP78 的高度诱导和合成<sup>[6-7]</sup>,并在抗药性形成方面发挥重要作用。

在肿瘤细胞中高度表达的 GRP78 可降低细胞毒性 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤力;可以对抗针对 G<sub>1</sub> 期和 S 期产生毒性的化学药物<sup>[8]</sup>,减少肿瘤细胞凋亡,并通过影响凋亡效应的作用来阻断化学药物引起的细胞死亡,促进肿瘤的生成和抗药性的产生。针对 GRP78 对肿瘤细胞的保护作用,抑制应激产生的 GRP78 可以增加肿瘤细胞凋亡,减慢肿瘤生长。在动物实验中证实染料木黄酮可以抑制 GRP 和热休克蛋白反应,从而抑制人类白血病肿瘤细胞生长<sup>[9]</sup>。预先诱导产生 GRP78 的肿瘤细胞能对拓扑异构酶 II 抑制剂(依托泊苷、ADR 等)产生耐药性,通过化疗或反义抑制战略降低 GRP78 表达水平可增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤力,同时依托泊苷、ADR 等药物也可通过一系列反应裂(下转第 561 页)

肌细胞培养中选用 0.1 mmol/L BrdU 于培养前 3 天在培养基中加入能满足实验需要。本实验在心肌细胞培养中还采取不同时期在培养液中添加不同血清以降低成纤维细胞的繁殖速度也能提高心肌细胞的收缩性能,效果显著<sup>[7]</sup>。

本研究用比较简单的试剂和器材,花费较少的人力、物力,成功地进行了新生大鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞的分离培养,且心肌细胞存活率高,细胞贴壁快,搏动早,心肌细胞和心肌成纤维细胞的纯度高,且操作简便,重复性好,是一种较为理想的心肌细胞和心肌成纤维细胞原代培养方法,可以满足心血管疾病发生、发展机制及心血管药物和心脏组织工程学的研究及多种生理生化实验的要求。

#### [参 考 文 献]

- [1] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol [J]. *Circ Res*, 1982, 50(1): 101 - 116.
  - [2] 陈勇兵, 陈如坤, 陈力, 等. 乳鼠心肌成纤维细胞培养方法的改进 [J]. *江苏医药*, 2005, 31(3): 189 - 190.
  - [3] Miki N, Hamamori Y, Hirata K, *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  1 potentiated  $\alpha$  1-adrenergic and stretch-induced c-fos mRNA expression in rat myocardial cells [J]. *Circ Res*, 1994, 75(1): 8 - 14.
  - [4] Souren JE, Schenijdenberg C, Verkleij AJ, *et al.* Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1992, 28A (3 Pt 1): 199 - 204.
  - [5] Bartoli M, Claycomb WC. Transfer of macromolecules into living adult cardiomyocytes by microinjection [J]. *Mol Cell Biochem*, 1997, 172(1/2): 103 - 109.
  - [6] Clark WA, Decker ML, Janes DM, *et al.* Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocytes hypertrophy and survival in longterm primary culture [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(1): 139 - 155.
  - [7] 周正任, 金红, 张卓然. 啮齿类动物细胞培养 [M] // 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 65 - 76.
- 
- (上接第 557 页)解 GRP78, 导致协调抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>。
- 体外研究<sup>[11]</sup>显示, GRP78 与肿瘤关系密切, 肿瘤细胞恶性程度性地合成 GRP78 维持内环境的稳定, 构筑自身防御机制, 保护肿瘤细胞逃避化疗药物的杀伤作用。可见, ADR 上调 GRP78 的表达是人乳腺癌 SK-BR-3 细胞对 ADR 诱导细胞凋亡敏感性下降的原因之一。利用 siRNA 干扰技术抑制 GRP78 的表达, 可以明显增高 ADR 诱导 SK-BR-3 细胞的凋亡率, 从而达到化疗增敏的目的。
- 综上所述, GRP78 的高表达是乳腺癌化疗耐药的重要原因之一, 抑制 GRP78 的合成可明显提高乳腺癌细胞的凋亡敏感性, 在其他方法不能地解决肿瘤抗药性及其转移问题的情况下, GRP78 的研究可为肿瘤化疗提供新的思路。
- #### [参 考 文 献]
- [1] Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock response in two leguminous plants; a comparative study [J]. *Exp Bot*, 2001, 52 (361): 1711 - 1719.
  - [2] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, *et al.* Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 275 - 284.
  - [3] Lee AS. GRP78 induction in cancer; therapeutic and prognostic implications [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3496 - 3499.
  - [4] Gazit G, Lu J, Lee AS. Deregulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 54(2): 135 - 146.
  - [5] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, *et al.* Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 59(1): 15 - 26.
  - [6] Jamora C, Dennert G, Lee AS. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/Bip induction in fibrosarcoma B/C 10ME [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 (15): 7690 - 7694.
  - [7] Xing X, Lai M, Wang Y, *et al.* Overexpression of glucose-regulated protein78 in colon cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1/2): 308 - 315.
  - [8] Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB, *et al.* Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2) [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222 (112): 49 - 59.
  - [9] Zhou Y, Lee AS. Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy [J]. *Natl Cancer Inst*, 1998, 90(5): 381 - 388.
  - [10] Reddy RK, Lu J, Lee AS. The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with  $Ca^{2+}$ -binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis [J]. *Biol Chem*, 1999, 274 (40): 28476 - 28483.
  - [11] 蒋志文, Le Bourhis X, Hondermarch H. 肿瘤细胞的进行性增殖和 Bip/GRP78 的合成 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(1): 79 - 83.