

## HER3 影响辐照诱导的 Luminal A 型乳腺癌细胞的迁移和侵袭

何国凤<sup>1</sup>,狄晓珂<sup>1</sup>,严菁菁<sup>1</sup>,孙新臣<sup>1</sup>,张 姝<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院放疗科,<sup>2</sup>临床研究中心,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨敲低人表皮生长因子受体-3(human epidermal growth factor receptor-3,HER3)表达及联合辐照对 Luminal A 型乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响及分子机制。方法:利用短发夹 RNA(shRNA)稳定转染乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR75-1,敲低 HER3 表达。蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测细胞转染效率。将转染空病毒的对照组(shRNA-Control)与 HER3 敲低组(shRNA-HER3)细胞进行 6-Gy X 线辐照,细胞划痕实验及侵袭实验(Transwell assay)分析各组乳腺癌细胞迁移和侵袭能力。Western blot 检测紧密连接蛋白 Claudin-1 的表达变化。结果:敲低 HER3 后,乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR75-1 内 HER3 蛋白表达水平明显降低。单纯辐照的乳腺癌细胞,迁移和侵袭能力增强,Claudin-1 蛋白表达增加;而敲低 HER3 及联合辐照后,乳腺癌细胞迁移和侵袭能力降低,Claudin-1 蛋白表达明显降低。结论:敲低 HER3 表达可以降低辐照诱导的 luminal A 型乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力,其机制可能通过下调紧密连接蛋白 Claudin-1 的表达而实现。

**[关键词]** HER3 基因;乳腺癌;辐照;迁移;侵袭

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)08-1059-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180809

## HER3 affects irradiation-induced migration and invasion in Luminal A breast cancer cells

He Guofeng<sup>1</sup>,Di Xiaoke<sup>1</sup>,Yan Jingjing<sup>1</sup>,Sun Xinchen<sup>1</sup>,Zhang Shu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiation Oncology,<sup>2</sup>Clinical Research Center,the First Affiliated Hospital of NMU,Nanjing 210029,China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of knockdown of human epidermal growth factor receptor-3 (HER3) expression on migration and invasion with irradiation (IR) in breast cancer cells and its molecular mechanism. **Methods:** Stable transfected breast cancer cells MCF-7 and ZR75-1 were established by short hairpin RNA (shRNA) to knockdown the expression of HER3 gene. The transfection efficiency was detected by Western blot. The control group transfected with empty virus and HER3 knockdown group were irradiated by 6-Gy X-ray. Cell healing assay and Transwell assay were used to analyze the migration and invasion ability of breast cancer cells. Western blot was used to detect the expression of Claudin-1. **Results:** After knockdown of HER3, HER3 protein expression in MCF-7 and ZR75-1 cells was significantly decreased. After IR, the migration and invasion increased, and the expression of Claudin-1 protein increased. However, knockdown of HER3 and combined IR reduced the migration and invasion of breast cancer cells, and decreased the expression of Claudin-1. **Conclusion:** Knockdown of HER3 reduces the migration and invasion of Luminal A breast cancer cells after IR. Its mechanism may be through the down-regulation of Claudin-1 expression.

**[Key words]** HER3;breast cancer;irradiation;migration;invasion

[Acta Univ Med Nanjing,2018,38(08):1059-1063]

乳腺癌转移是导致临床治疗失败的主要原因,严重威胁着患者的生命<sup>[1]</sup>,因此探索乳腺癌转移的

相关分子标志物,对于改善乳腺癌患者的预后及指导临床治疗具有重要意义。与正常乳腺组织相比,约 50%的乳腺癌患者存在 HER3 蛋白过表达,而且 HER3 蛋白过表达与乳腺癌的远处转移有关<sup>[2-3]</sup>。HER3 是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)家族(EGFR/HER1、HER2、HER3、

**[基金项目]** 江苏省青年医学重点人才(QNRC2016571)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhangshu@njmu.edu.cn

HER4)中的一员,主要由3个结构域组成,即胞外配体结合域(ECD)、跨膜区(TM)和胞内酪氨酸激酶结合域(ICD)。由于HER3的酪氨酸激酶活性较弱,其主要与EGFR家族中的其他成员形成异二聚体,尤其是与EGFR和HER2,导致HER3羧基端酪氨酸残基的磷酸化,从而激活RAS/RAF/MAPK和PI3K/AKT信号通路<sup>[4]</sup>。

放射治疗作为乳腺癌局部控制的主要手段,已经广泛用于保乳术后或乳房切除术后的患者。既往很少着重于放射治疗与靶向HER3在乳腺癌迁移和侵袭方面的研究,本研究旨在阐明辐照下HER3与乳腺癌迁移和侵袭的关系,探讨靶向HER3联合辐照对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响及可能的作用机制,为提高乳腺癌患者放射治疗效果提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞株MCF-7和ZR75-1(中国科学院上海生物化学及细胞生物研究所),新生牛血清、RPMI-1640培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(Gibco公司,美国),胰酶(Sigma公司,美国),慢病毒构建的shRNA-HER3及对照shRNA-Control(上海吉玛公司),Transwell试剂盒(中国康宁公司),RIPA裂解液、嘌呤霉素(上海碧云天生物技术有限公司),青霉素、链霉素、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(中国凯基生物),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,上海碧云天生物技术有限公司),PVDF膜(Merck millipore公司,美国),脱脂奶粉,TBST缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司),GAPDH、HER3、p-HER3、Claudin-1单克隆抗体(CST公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与辐照

人乳腺癌细胞株MCF-7和ZR75-1贴壁培养于含10%新生牛血清的RPMI-1640培养基中,青、链霉素终浓度为100 U/mL,细胞培养于37℃含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中。取对数生长期、状态良好的乳腺癌细胞,胰酶消化后接种于直径10 cm的细胞培养皿中,继续培养,2~3 d更换含有血清的培养基。取贴壁培养达到70%~80%的细胞,通过X-射线辐射器(Elekta公司,瑞典)给予细胞6-Gy的单剂量照射。

#### 1.2.2 短发夹RNA(shRNA)敲低HER3

取对数生长期的MCF-7和ZR75-1细胞,按3×

10<sup>5</sup>个/皿接种于中皿中,37℃过夜。待细胞融合度达到50%左右,按照病毒转染步骤进行转染。转染后培养48~72 h,胰酶消化分皿培养贴壁后予嘌呤霉素4、8 μg/mL进行筛选,1周后用Western blot检测蛋白水平的敲低效果。

#### 1.2.3 细胞迁移实验

取对数生长期细胞,胰酶消化后按2×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板,待贴壁生长达到80%~90%后,辐照组在常温下给予6 Gy单剂量辐照。在无菌操作台中用20 μL枪头在中央划十字,用PBS清洗2遍,更换无血清培养基,在显微镜下拍照,后继续于37℃含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养24、48 h,继续同前清洗细胞、更换培养基,同部位拍照。

#### 1.2.4 细胞侵袭实验

提前12 h在小室底部添加50 μL稀释好的Matrigel胶。取对数生长期细胞,辐照组在常温下给予6 Gy单剂量辐照,胰酶消化细胞,用PBS及无血清培养基各洗涤1次,用无血清培养基悬浮细胞,调整细胞浓度为10×10<sup>6</sup>个/mL。在24孔板底部加入500 μL含有10%新生牛血清的培养基,上室加入200 μL的细胞悬液,继续在细胞培养箱中培养48 h,48 h后取出上室,用棉签吸干上室培养基,移到事先加入600 μL甲醇的24孔板中,室温固定30 min,取出上室,棉签吸干上室液体,移入事先加入600 μL结晶紫的24孔板中,室温染色1 h,取出上室,放入PBS中清洗,用棉签小心抹去上室底部膜上的细胞,37℃烘干箱中烘干。显微镜下随机取5个视野计数,统计结果。

#### 1.2.5 蛋白免疫印迹实验

取贴壁生长达70%~80%的细胞,辐照组给予6-Gy单剂量辐照,继续培养箱中培养24 h。用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞后提取总蛋白。通过BCA蛋白定量试剂盒定量蛋白浓度。分别取80 μg蛋白,通过SDS-PAGE分离蛋白质并转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,加一抗4℃过夜,次日TBST缓冲液漂洗3次,每次15 min,加二抗常温孵育1 h后TBST缓冲液漂洗3次,每次15 min。电化学发光液显色后拍照,选用GAPDH为内参。

### 1.3 统计学方法

使用Prism 6.0软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用*t*检验,各实验组与对照组的差异比较采用双因素方差分析。*P* ≤ 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒构建的shRNA转染后,HER3蛋白表达明显降低

蛋白免疫印迹法检测MCF-7及ZR75-1细胞的shRNA-HER3的转染效率。与shRNA-Control相比,shRNA-HER3转染后,HER3蛋白表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。提示shRNA-HER3敲低乳腺癌细胞MCF-7和ZR75-1中HER3的表达(图1)。

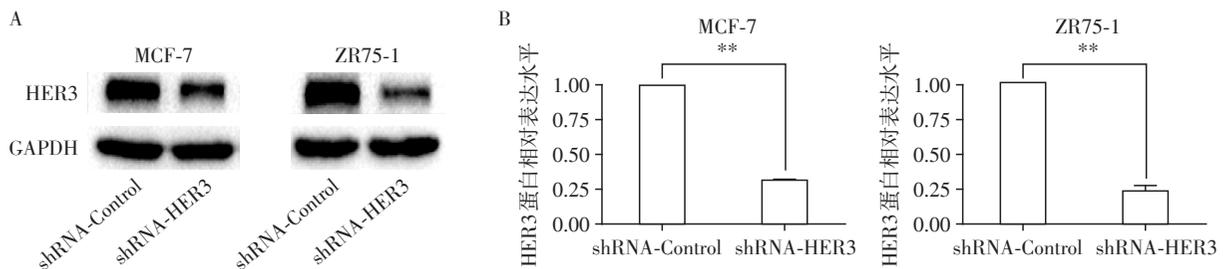
### 2.2 敲低HER3表达降低辐照诱导的Luminal A型乳腺癌细胞迁移、侵袭能力

细胞划痕实验显示,在单纯辐照组,随着培养时间的延长(24 h, 48 h),细胞逐渐向划痕处移动,

逐渐覆盖划痕,较对照组明显增多;而敲低HER3组及联合辐照组,细胞向划痕处迁移较对照组及单纯辐照组减少,尤其是和单纯辐照组相比,迁移明显减少。说明辐照增加了乳腺癌细胞的迁移能力,而敲低HER3能够降低辐照诱导的迁移能力(图2)。

Transwell实验显示,单纯辐照组,穿过小室的细胞数较对照组明显增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而敲低HER3及联合辐照后,穿过小室的细胞数较对照组及单纯辐照组明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。说明辐照增加了乳腺癌细胞的侵袭能力,而敲低HER3能够降低辐照诱导的侵袭能力(图3)。

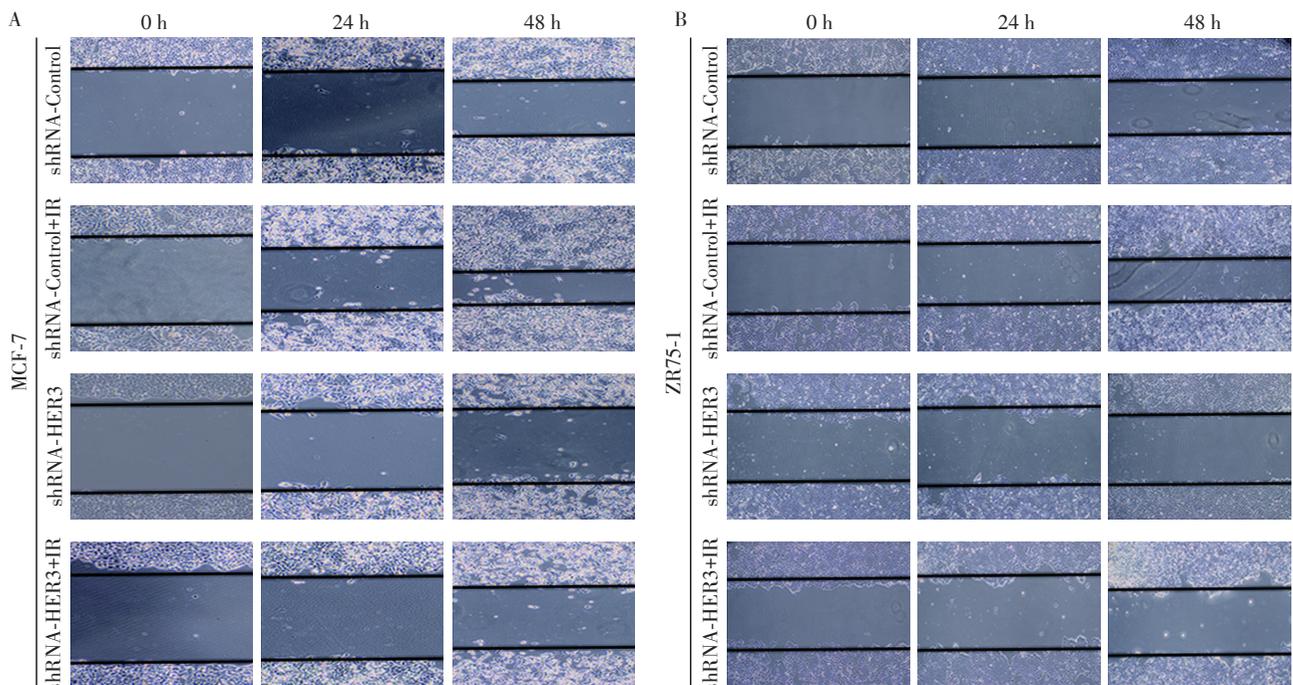
为了进一步验证本研究的发现,用Western blot



A: Western blot 检测 MCF-7 和 ZR75-1 细胞中对照组和敲低组 HER3 蛋白的表达; B: MCF-7 细胞中 HER3 蛋白相对表达水平; C: ZR75-1 细胞中 HER3 蛋白相对表达水平,与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

图1 慢病毒构建的shRNA转染MCF-7和ZR75-1细胞后,HER3蛋白表达降低

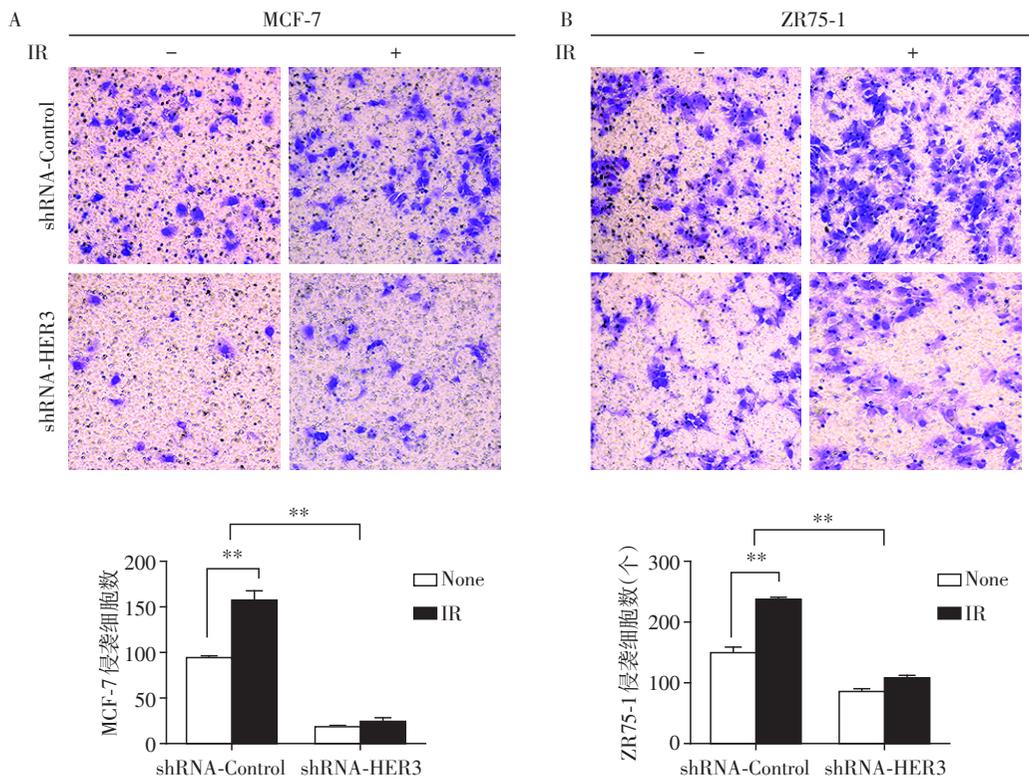
Figure 1 HER3 expression was decreased after transfected into lentivirus-constructed shRNA in MCF-7 and ZR75-1 cells



细胞划痕实验用于检测MCF-7(A)和ZR75-1(B)细胞中对照组与各实验组的迁移能力。

图2 敲低HER3表达降低辐照诱导的Luminal A型乳腺癌细胞的迁移能力( $\times 200$ )

Figure 2 Knockdown of HER3 reduced irradiation-induced migration of Luminal A breast cancer cells ( $\times 200$ )



Transwell实验用于检测MCF-7(A)和ZR75-1(B)细胞中对照组与各实验组的侵袭能力(\* $P < 0.01$ )。

图3 敲低HER3表达降低辐照诱导的Luminal A型乳腺癌细胞的侵袭能力( $\times 400$ )

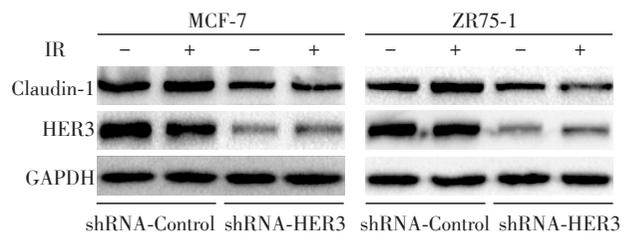
Figure 3 Knockdown of HER3 reduced irradiation-induced invasion of Luminal A breast cancer cells ( $\times 400$ )

检测紧密连接蛋白Claudin-1的表达。研究发现,与对照组相比,单纯辐照组的Claudin-1蛋白表达增加,而敲低HER3组及联合辐照组,Claudin-1蛋白表达明显降低。说明辐照能够增加Claudin-1蛋白表达,增加乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力,而敲低HER3及联合辐照能够降低Claudin-1蛋白的表达,从而降低乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力(图4)。

### 3 讨论

既往研究普遍认为上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是乳腺癌远处转移的重要机制,同时也有研究表明,紧密连接蛋白在乳腺癌细胞EMT中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。

紧密连接是上皮细胞间连接的重要结构,其中Claudins蛋白的功能最为重要,具有维持细胞间黏附性、通透性及细胞极性的作用。Claudins蛋白表达异常可导致上皮细胞与内皮细胞结构破坏、功能受损。有研究表明,其在多种上皮来源的肿瘤中表达异常,提示Claudins蛋白可能在肿瘤的迁移、侵袭过程中发挥重要作用。Claudin-1是Claudins家族中的一员,其在不同组织的肿瘤中的表达具有差异



Western blot用于检测MCF-7和ZR75-1细胞中,对照组与各实验组内HER3和Claudin-1蛋白的表达。

图4 敲低HER3表达降低辐照诱导的紧密连接蛋白Claudin-1的表达

Figure 4 Knockdown of HER3 reduced Claudin-1 protein expression induced by irradiation

性,但无论是上调或下调都与肿瘤的发生、发展有关。有研究表明,在脑肿瘤、黑色素瘤、前列腺癌、子宫内膜癌及肺癌中,Claudin-1的表达缺失与肿瘤的浸润和转移有关;相反,在鼻咽癌、结肠癌、卵巢癌和口腔癌中,Claudin-1的表达上调预示着肿瘤的侵袭和发展;而在乳腺癌中,Claudin-1的临床意义仍然存在争议<sup>[6-9]</sup>。有研究表明,Claudin-1的缺失或低表达,能够促进乳腺癌的浸润及转移作用<sup>[7]</sup>,也有研究表明,在某些特定分子分型的乳腺癌中,Claudin-1

din-1的表达上调预示着肿瘤的侵袭和发展<sup>[8-9]</sup>。

本研究将HER3与辐照、Claudin-1蛋白进行关联。研究发现单纯辐照 luminal A型乳腺癌细胞 MCF-7和ZR75-1, Claudin-1的表达明显上调,同时乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力明显增强,而敲低HER3表达后, Claudin-1的表达明显降低,细胞迁移和侵袭能力减弱。因此本研究提示, Claudin-1在 Luminal A型乳腺癌细胞中可能起类似促癌基因的作用,它的高表达可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。鉴于 Claudin-1在乳腺癌迁移、侵袭方面的相悖研究,其原因可能是 Claudin-1在不同乳腺癌分子亚型中的作用不同或截然相反,所以未来仍然需要进一步研究细化辐照后, HER3与 Claudin-1在不同乳腺癌亚型中的作用,以期为临床放射治疗提供新思路。

#### [参考文献]

- [1] Lim B, Hortobagyi GN. Current challenges of metastatic breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 495-514
- [2] Bieche I, Onody P, Tozlu S, et al. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(5): 758-765
- [3] Bae SY, La Choi Y, Kim S, et al. HER3 status by immuno-

histochemistry is correlated with poor prognosis in hormone receptor-negative breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(3): 741-750

- [4] Mujoo K, Choi BK, Huang Z, et al. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(21): 10222-10236
- [5] Choi Y, Lee HJ, Jang MH, et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of *in situ* to invasive basal-like breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(11): 2581-2589
- [6] Zhou B, Moodie A, Blanchard AA, et al. Claudin 1 in breast cancer: New insights[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(12): 1960-1976
- [7] Blanchard AA, Ma X, Dueck KJ, et al. Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 268
- [8] Zhao X, Zou Y, Gu Q, et al. Lentiviral vector mediated claudin1 silencing inhibits epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Viruses*, 2015, 7(6): 2965-2979
- [9] Zhou B, Blanchard A, Wang N, et al. Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anti-cancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7[J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(9): 429-439

[收稿日期] 2018-03-01



欢迎关注本刊微博、微信公众号!