

不同HER-2表达水平对乳腺癌细胞生物学行为的影响

张杰, 郑慧, 卢仁泉, 郭林

复旦大学附属肿瘤医院检验科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)属于受体酪氨酸激酶中的生长因子受体家族, 其表达差异在乳腺癌靶向药物的临床使用中起决定作用。该研究旨在筛选出HER-2不同表达水平的乳腺癌细胞株, 研究HER-2表达差异对肿瘤细胞生物学行为的影响。**方法:** 对乳腺癌细胞系SK-BR-3进行克隆纯化, 利用德国西门子公司ADVIA Centuar CP系统电化学发光技术检测细胞培养上清液中可溶性HER-2(soluble HER-2, sHER-2)的表达水平, 筛选出sHER-2高表达细胞株(大于50.0 ng/mL)、中表达细胞株(15.8~50.0 ng/mL)及低表达细胞株(小于15.8 ng/mL)。通过细胞培养观察以上3种乳腺癌细胞株的形态学变化, 并通过一系列体外实验比较细胞的生物学特性, 包括克隆形成实验、划痕实验和Transwell检测等。**结果:** 与正常乳腺上皮细胞相比, 乳腺癌细胞系SK-BR-3表达的sHER-2水平明显增高。其中, sHER-2高表达细胞株的克隆形成率为(51.3 ± 3.4)%, 明显高于中表达细胞株 [(42.0 ± 3.7)%] 和低表达细胞株 [(26.7 ± 2.9)%]; sHER-2高表达细胞株的迁移率为(50.0% ± 0.6)%, 明显高于sHER-2中表达细胞株 [(19.5 ± 3.4)%] 和sHER-2低表达细胞株 [(13.6 ± 1.0)%]; sHER-2高表达细胞株的侵袭能力为(53.5 ± 4.2)%也明显比sHER-2中表达细胞株 [(33.2 ± 3.9)%] 和低表达细胞株 [(28.9 ± 5.4)%] 细胞株强, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 乳腺癌sHER-2高表达细胞株具有促增殖、促细胞动力等生物学效应, 因此能为临床合理使用乳腺癌靶向药物提供参考依据。

[关键词] 乳腺癌; 可溶性人表皮生长因子受体-2; 细胞侵袭; 增殖; 迁移

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.03.007

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)03-0201-06

The effect of different expression levels of HER-2 on the biological characteristics of breast cancer cells ZHANG Jie, ZHENG Hui, LU Renquan, GUO Lin (Department of Clinical Laboratory, Fudan University Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: GUO LIN E-mail: guolin500@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) is the member of tyrosine kinase receptor family. Its differential expression plays the key role in choosing targeted drug for breast cancer. This study focused on screening the breast cancer cell clones of different HER-2 expression levels, and studying the biological characteristics of these cells. **Methods:** Breast cancer SK-BR-3 cells were clonally purified, and the expression level of soluble HER-2 (sHER-2) from the culture supernatant was detected by the ECLIA on ADVIA Centaur CP System. Cell clones with high expression (>50.0 ng/mL), medium expression (15.8-50.0 ng/mL) and low expression (<15.8 ng/mL) of sHER-2 were identified, respectively. This study observed the morphological changes of cell strains with differential expression levels of sHER-2 by cell culture. Besides, biological characteristics were compared by a series of experiments *in vitro*, such as clone formation, scratch assay, and transwell detection. **Results:** Compared with normal breast cells, sHER-2 was overexpressed significantly in SK-BR-3 breast cancer cells. Furthermore, the abilities of clone formation, mobility and invasion of sHER-2 high expression cell strain [(51.3 ± 3.4)%, (50.0 ± 0.6)% and (53.5 ± 4.2)%] were significantly higher than those of sHER-2 medium expression [(42.0 ± 3.7)%, (19.5 ± 3.4)% and (33.2 ± 3.9)%] or sHER-2 low expression [(26.7 ± 2.9)%, (13.6 ± 1.0)% and (28.9 ± 5.4)%], and the differences were all statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: Breast cancer cell strain with high expression level of sHER-2 can enhance cell proliferation, promote cell motility and other biological effects, which may lay the foundation for clinical screening of targeted drug therapies for breast cancer.

[**Key words**] Breast cancer; Soluble human epidermal growth factor receptor-2; Cell invasion; Proliferation; Migration

乳腺癌是危害女性健康最常见的恶性肿瘤,且其死亡率呈明显上升趋势。人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)是一种与细胞的增殖和分化有关的上皮生长因子受体,在多种正常组织中低表达。前期研究证实,有25%~30%的乳腺癌患者HER-2基因高表达^[1]。还有研究表明18%~20%乳腺癌患者体内血清可溶性HER-2(soluble HER-2, sHER-2)过高表达与乳腺癌患者的预后复发及治疗方案均有关系,提示预后差,容易复发和转移,其表达水平的检测已作为一个独立指标用于对肿瘤生物学行为的判断^[2]。本研究通过建立不同sHER-2表达水平的乳腺癌细胞株,并且对其生物学特性进行研究,不但可以为研究sHER-2过表达与乳腺癌治疗方面相关性提供理想的细胞模型,而且还能为乳腺癌个体化治疗奠定基础。目前HER-2基因及蛋白表达的研究主要采用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、免疫组织化学检测、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和ADVIA Centaur检测等。本研究利用FISH与ADVIA Centaur检测的方法进行分析、探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系SK-BR-3来自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),正常人乳腺上皮细胞由复旦大学附属肿瘤医院乳腺癌研究中心惠赠。通过化学发光的方法进行检测细胞培养液上清液中sHER-2的表达水平,检测仪器为ADVIA Centaur CP,购自德国西门子公司。细胞培养所需试剂包括DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶及青、链霉素双

抗均购自美国Gibco公司。

1.2 细胞培养及sHER-2测定

细胞在包含15%胎牛血清和含青、链霉素双抗的DMEM完全培养液中生长,于37℃、CO₂体积分数为5%的环境中培养,待对数生长期的细胞汇合度达到70%~80%,吸出培养液,检测培养液中sHER-2值。

1.3 sHER-2不同表达细胞株筛选

取对数生长期的乳腺癌细胞,每孔接种100个细胞于24孔板上,每24~48 d后传代1次,共10次。对传代细胞培养液进行sHER-2浓度检测(共24个孔),并筛选出高、中和低表达水平的细胞克隆进行培养。取对数生长期的乳腺癌细胞,共3组(sHER-2高表达组、中表达组和低表达组),每孔接种100个细胞于6孔板上,待细胞数达50%生长融合时,用FISH法进行验证。

1.4 平板克隆形成实验测定细胞克隆形成率

取对数生长期的乳腺癌细胞,共3组(sHER-2高表达组、中表达组和低表达组),每孔接种100个细胞于6孔板上,10~14 d后终止培养。固定、染色后,显微镜下计数有效克隆数(超过50个细胞数的克隆为有效克隆)并计算克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆数/实际接种细胞数×100%,每组设3个复孔。

1.5 细胞划痕实验判断细胞生长能力

取对数生长期的乳腺癌细胞,共3组(sHER-2高表达组、中表达组和低表达组),以每孔10⁵个接种于24孔板,待细胞数达50%生长融合时,用移液枪头沿培养板底部呈一字型划痕,分别于培养1和48 h时倒置显微镜下测量划痕的宽度。细胞迁移率(%)=(1-测量时划痕宽度/初始划痕宽度)×100%。重复试验4次^[3]。

1.6 Transwell试验检测细胞侵袭能力

取对数生长期的乳腺癌细胞,共3组

(sHER-2高表达组、中表达组和低表达组), 每孔接种5 000个细胞于Transwell孔板内。24~36 d后终止培养。固定、染色后, 在显微镜下观察细胞穿孔情况并进行计数。相对细胞侵袭率(%)=穿透细胞总数/5 000 × 100%。

1.7 CA153的检测方法

使用电化学发光法进行检测, 使用仪器为罗氏诊断产品(上海)有限公司COBAS 600(CA153使用国际单位U/mL)。

1.8 统计学处理

实验结果采用SPSS 19.0统计软件进行分析, 细胞生长及存活曲线用SigmaPlot 10.0统计软件拟合, 图表使用GraphPad Prism软件绘制。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验和方差分析比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞系sHER-2水平明显增高

乳腺癌细胞系SK-BR-3和正常乳腺上皮细胞均培养至对数生长期, 吸出培养液, 检测培养液中sHER-2表达水平。SK-BR-3细胞培养上清液中sHER-2浓度为 (51.9 ± 4.4) ng/mL, 明显高于对照组正常乳腺上皮细胞 (10.0 ± 1.8) ng/mL, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

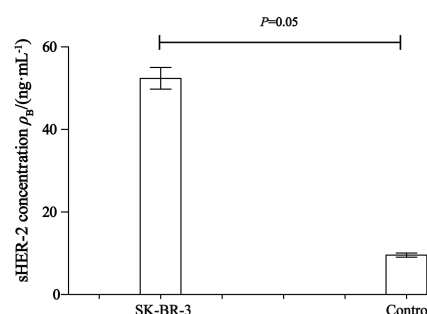


图1 两组细胞株之间sHER-2表达水平的比较

Fig. 1 The comparison of sHER-2 expression levels between the two groups of cell lines

2.2 乳腺癌细胞系SK-BR-3中sHER-2不同浓度表达细胞株建立

将SK-BR-3细胞系经克隆化培养, 得到不同sHER-2表达浓度的细胞株。将15.8 ng/mL作为sHER-2最佳的cut-off值具有99.1%的特异度和16.1%的灵敏度, 小于15.8 ng/mL的细胞株作为sHER-2低表达株; 15.8~50.0 ng/mL的细胞株作为sHER-2中表达株; 大于50.0 ng/mL的细胞株作为sHER-2高表达株^[4]。

将上述克隆纯化后培养的3株sHER-2不同表达水平细胞株再利用FISH法进行验证, FISH检测结果与ADVIA Centaur法检测细胞培养上清液中sHER-2浓度结果相一致(图2)。

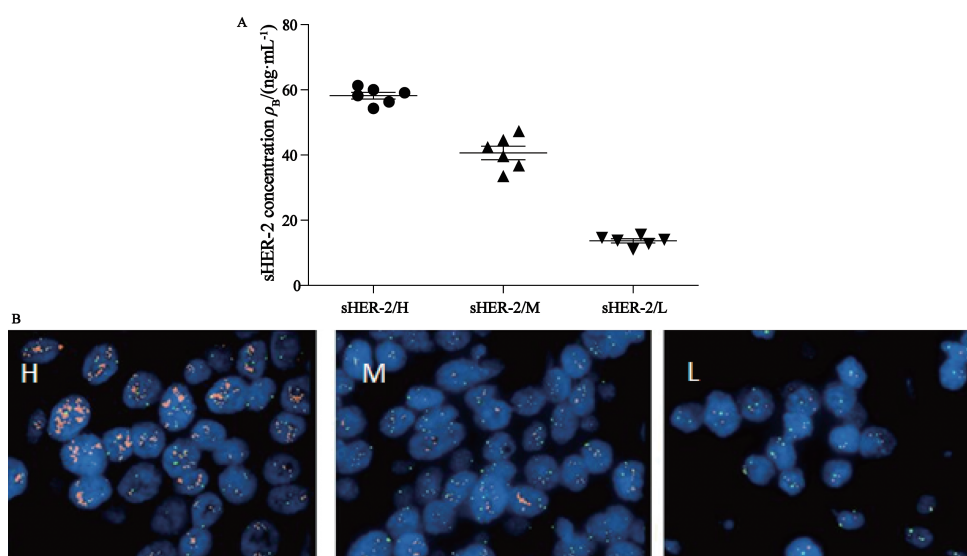


图2 sHER-2高、中和低表达乳腺癌细胞株建立

Fig. 2 Establishment of breast cancer cell clones with high, medium and low sHER-2 expression

A: ADVIA centaur assay method; B: FISH detection method; H: High expression; M: Medium expression; L: Low expression

(× 40)

2.3 细胞克隆形成率的检测

sHER-2高表达、中表达和低表达细胞株克隆形成率分别为 $(51.3 \pm 3.4)\%$ 、 $(42.0 \pm 3.7)\%$ 和

$(26.7 \pm 2.9)\%$, sHER-2高表达组细胞的克隆形成能力明显高于其他两组细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。

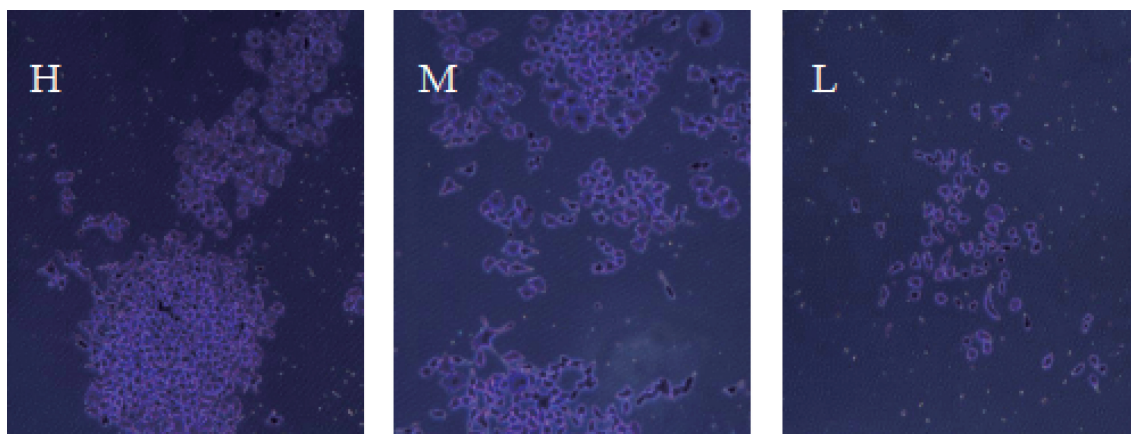


图3 高、中和低表达细胞染色后的镜下克隆

Fig. 3 The image of cell clones with high, medium and low sHER-2 expression concentration

H: High expression; M: Medium expression; L: Low expression

2.4 细胞生长能力比较

划痕后培养1 h时, sHER-2高表达组细胞sHER-2高表达细胞株迁移率与中、低两组细胞差异无统计学意义($P > 0.05$)。48 h后, 发现sHER-2高表达细胞株的生长能力明显强于中、低两组细胞, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1, 图4)。

表1 sHER-2不同表达水平对细胞迁移能力的影响

Tab. 1 The effect of sHER-2 expression level on cell mobility

Group	1 h	48 h	Mobility ($\bar{x} \pm s$)
sHER-2 high expression	20.5 \pm 1.3	10.3 \pm 1.0	(50.0 \pm 0.6)%*
sHER-2 medium expression	21.3 \pm 1.1	16.3 \pm 1.8	(19.5 \pm 3.4)%
sHER-2 low expression	20.5 \pm 1.7	17.5 \pm 1.3	(13.6 \pm 1.0)%

*: $P < 0.05$, as compared with other two groups

2.5 细胞侵袭能力比较

本研究通过Transwell实验检测发现SK-BR-3细胞系中分选出来的sHER-2高表达细胞株的穿膜率为 $(53.5 \pm 4.2)\%$, 明显强于sHER-2高表达细胞株 [$(33.2 \pm 3.9)\%$] 和sHER-2低表

达细胞株 [$(28.9 \pm 5.4)\%$], 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。

2.6 sHER-2检测与CA153检测情况比较

本研究结果发现, 高、中和低表达组sHER-2检测结果与CA153检测结果呈正相关(图6)。

3 讨 论

乳腺癌是我国最常见的女性恶性肿瘤, 发展迅速, 发病率更是位居女性癌症首位。化疗耐药和转移复发是乳腺癌难以根治的主要原因^[5]。本研究通过检测sHER-2在乳腺癌细胞中表达水平, 建立不同表达水平的乳腺癌细胞系, 并对其生物学特性进行研究分析, 也可为临床医生使用靶向药物提供依据。

目前曲妥珠单抗主要用于治疗HER-2过表达的乳腺癌患者^[6]。然而, 并非所有患者都对此药物敏感, 原因可能是由于肿瘤细胞内sHER-2表达水平的差异, 致使在同一治疗条件下患者的治疗效果也会有所不同。

本研究结果表明, 乳腺癌细胞组和正常乳腺上皮细胞之间sHER-2表达水平差异显著, 本

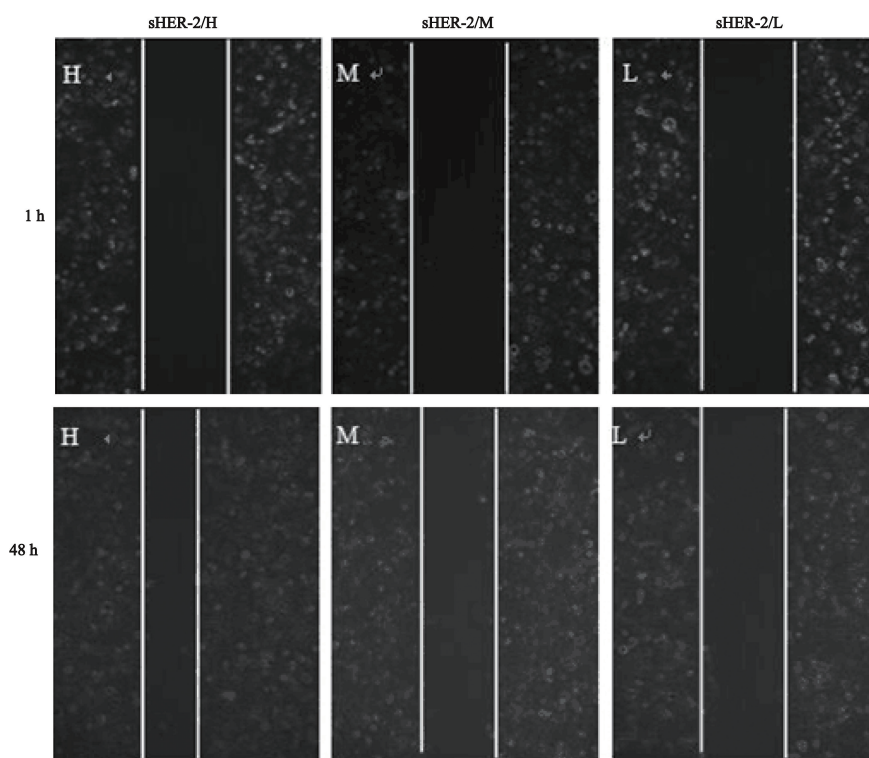


图4 高、中和低表达细胞生长情况

Fig. 4 The cell growth status of sHER-2 high, medium and low expression cell clones

H: High expression; M: Medium expression; L: Low expression

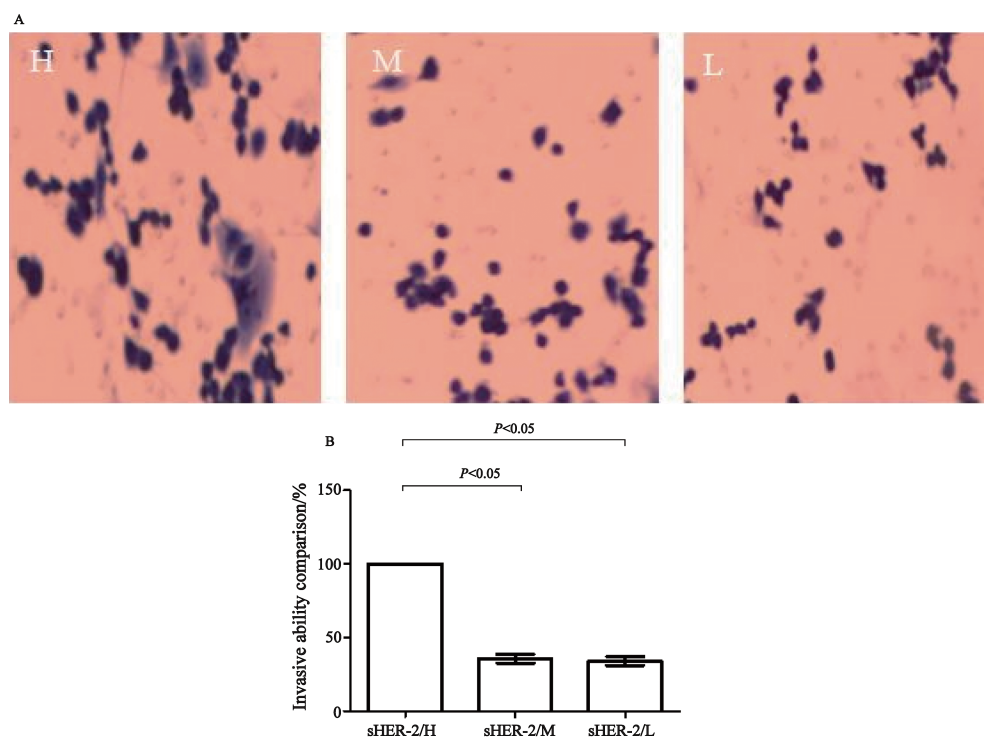


图5 高、中和低表达细胞侵袭能力

Fig. 5 The invasion ability of sHER-2 high, medium and low expressions cell clones

A: The example of cells with high, medium and low sHER-2 expressions concentration moving across the transwell holes; B: Comparison of invasion ability among the three cell clones; H: High expression; M: Medium expression; L: Low expression

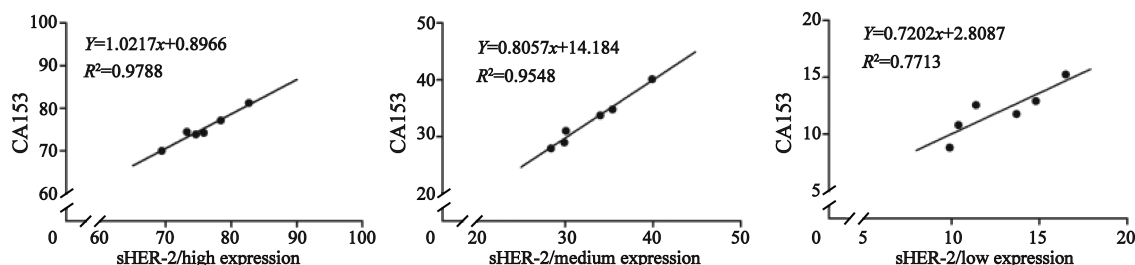


图6 3组sHER-2检测与CA153之间相关性比较

Fig. 6 Correlation between sHER-2 and CA153 in 3 groups

研究在乳腺癌细胞系中通过sHER-2检测区分建立高、中和低表达水平的细胞株, 再对三者进行进一步的生物学特性研究。通过克隆形成实验发现, 在相同条件下, sHER-2高表达细胞株增殖更快。此外, 本研究通过增殖迁移实验和侵袭实验发现sHER-2高表达细胞株的迁移和侵袭能力要明显强于sHER-2中、低表达细胞株, 与克隆形成实验结果相符。王英哲等^[7]的研究结果显示, 恶性乳腺癌中sHER-2高表达患者病情严重程度、转移和复发的概率以及预后等都要高于其他乳腺癌患者。本研究结果与该文献报道结果一致。

综上所述, 本研究发现高表达sHER-2的乳腺癌细胞具有促增殖、促细胞动力等生物学效应, 在乳腺癌发生、发展中起着重要作用。这一研究结果可为临床上针对sHER-2表达不同患者合理使用靶向药物治疗提供数据支持及实验依据, 有关sHER-2高表达是否为乳腺癌预后不良的因子之一, 还值得进一步研究、探索。

[参 考 文 献]

- [1] 袁 芃, 徐兵河, 齐 军, 等. 乳腺癌患者血清与肿瘤组织中HER-2/neu表达的相关性研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2004, 9(5): 49-52.
- [2] HYNES N E, MACDONALD G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2): 177-184.
- [3] REEDIJK M, ODORCIC S, CHANG L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8530-8537.
- [4] MURPHY C G, MODI S. HER-2 breast cancer therapies: a review [J]. *Biologics*, 2009, 19(6): 1068-1074.
- [5] 韩 铭, 邓 华, 瑜隆玲, 等. 赫赛汀对乳腺癌SK-BR-3细胞Notch-1信号通路的影响及意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(11): 448-489.
- [6] 姜 扩, 王立锋, 裘秀春, 等. HER-2与乳腺癌靶向治疗的研究进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2010, 25(4): 109-125.
- [7] 王英哲, 司 文, 杨俊兰, 等. 腺癌复发转移前后激素受体、HER-2表达的改变及其临床意义 [J]. *解放军医学院学报*, 2015, 12(5): 766-815.

(收稿日期: 2016-08-01 修回日期: 2016-11-30)