

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·05·007

· 基础研究 ·

## 携带 *PTEN* 基因重组腺病毒对群司珠单抗耐药乳腺癌细胞的逆转作用

肖 鸣, 王雅杰\* (第二军医大学附属长海医院肿瘤科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究重组腺病毒介导的野生型 *PTEN* 基因转染对群司珠单抗(trastuzumab)耐药性乳腺癌细胞的逆转作用。方法: 构建携带野生型 *PTEN* 基因的重组腺病毒 AdPTEN, 感染群司珠单抗耐药性乳腺癌细胞株 BT474, MTT 比色法和 FCM 检测 AdPTEN 感染对群司珠单抗作用下 BT474 细胞增殖和凋亡的影响; DNA 片段化实验分析 BT474 凋亡与感染时间的关系; Western blotting 法检测 AdPTEN 感染对 BT474 细胞中丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)磷酸化水平的影响。建立荷乳腺癌裸鼠模型, 观察 AdPTEN 联合群司珠单抗治疗对乳腺癌移植瘤生长的影响, 检测移植瘤细胞中 *PTEN* 蛋白的表达、细胞凋亡、超微结构的改变。结果: 成功构建重组腺病毒 AdPTEN, 其滴度为  $4.2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/ml。PCR、RT-PCR 和 Western blotting 法证实 *PTEN* 基因可被转入 BT474 细胞内并稳定高效表达。AdPTEN 联合群司珠单抗处理对 BT474 细胞增殖的抑制非常显著地强于单用群司珠单抗治疗 ( $P < 0.01$ ); 细胞出现明显凋亡, 凋亡率为  $(20.7 \pm 5.83)\%$ , 并且出现 G<sub>1</sub> 期阻滞和 S 期明显减少, 与 AdLacZ 组和对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 感染组细胞 DNA 出现典型的梯形条带, 以感染后 24 ~ 36 h 最为明显; AdPTEN 感染明显下调 BT474 细胞内 Akt 的磷酸化水平。AdPTEN 和群司珠单抗联合治疗可强烈抑制裸鼠移植瘤生长, 疗效明显强于群司珠单抗治疗组 ( $P < 0.01$ ); AdPTEN 治疗后, 移植瘤细胞中 *PTEN* 表达明显, TUNEL 和电镜检测均证实乳腺癌移植瘤细胞的凋亡。结论: AdPTEN 治疗可抑制 BT474 细胞 Akt 的磷酸化, 阻断 PI3K/Akt 信号通路的持续活化, 恢复耐药细胞对群司珠单抗的敏感性, 引起细胞凋亡。

[关键词] 乳腺癌; 群司珠单抗; 耐药; *PTEN*; 基因治疗; 耐药逆转

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0433-07

## Reversal of drug resistance of trastuzumab-resistant human breast cancer cells by recombinant adenovirus carrying *PTEN* gene

XIAO Ming, WANG Ya-jie\* (Department of Oncology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of adenoviral-mediated *PTEN* gene transfection in reversing drug resistance of trastuzumab-resistant human breast cancer. **Methods:** Recombinant adenoviruses carrying *PTEN* gene (AdPTEN) were constructed and transfected into trastuzumab-resistant human breast cancer cell line BT474. Proliferation and apoptosis of BT474 cells treated with AdPTEN and trastuzumab were measured by MTT assay and FCM. Time course of BT474 cells apoptosis induced by AdPTEN was analyzed by detection of DNA fragmentation. Western blotting was employed to measure phosphorylated-Akt expression levels in AdPTEN treated BT474 cells. The nude mice model of BT474 cells was employed to observe the effects of AdPTEN and trastuzumab on trastuzumab-resistant human breast cancer *in vivo*. The expression of *PTEN* gene, cancer cells apoptosis and ultrastructural changes were evaluated after the mice were sacrificed. **Results:** We successfully constructed recombinant AdPTEN; and the titer of the recombinant adenovirus was about  $4.2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/ml. *PTEN* gene expression was identified by PCR, RT-PCR and Western blotting assay. Combinatorial AdPTEN and trastuzumab significantly suppressed the proliferation of BT474 cells and induced the apoptosis. The percentage of apoptosis cells treated with AdPTEN was  $(20.7 \pm 5.82)\%$ , accompanied by cells cycle arrest in G<sub>1</sub> phrase ( $P < 0.01$ ). DNA of AdPTEN treated BT474 showed a typical DNA ladder at 24 - 36 h after infection. An obvious down-regulation of phosphorylated-Akt expression level in cancer cells was identified by Western blotting. Tumor growth was inhibited in nude mice receiving injection of the recombinant adenoviruses when compared to control mice treated with AdLacZ ( $P < 0.01$ ).

[基金项目] 上海市科学技术委员会资助项目(No. 06DZ19509)。Supported by the Shanghai Science and Technology Commission Foundation (No. 06D219509)

[作者简介] 肖 鸣(1981-), 上海市人, 硕士, 住院医师, 主要从事消化道肿瘤、乳腺癌方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: yaliewa0459@163.com

PTEN protein expression was confirmed by immunohistochemistry. Tumor cell apoptosis was detected by TUNEL and electron microscopy scanning. **Conclusion:** Our result suggests that PTEN protein can down-regulate phosphorylated-Akt and Akt kinase activity, and block the activation of PI3K/Akt pathway, and subsequently reverse trastuzumab resistance and induce cell apoptosis.

[ **Key words** ] breast cancer; trastuzumab( Herceptin ); drug resistance; *PTEN*; gene therapy; reversal of drug resistance  
[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 433-439 ]

群司珠单抗( trastuzumab; 商品名为赫赛汀, Herceptin )的临床应用使部分 HER-2 过表达的乳腺癌患者临床受益,但单药治疗的客观有效率不高,约为 12% ~ 34%,且大部分初始接受治疗有效的患者常在 1 年内产生耐药,所以探讨该药的耐药机制及逆转方法具有重要的意义。

有研究<sup>[14]</sup>显示,群司珠单抗耐药肿瘤细胞株中 PI3K/Akt 信号通路在群司珠单抗存在的情况下仍持续活化,提示针对 PI3K 的靶向治疗也许能逆转群司珠单抗耐药;而 *PTEN*( phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten )功能缺失会导致 PI3K/Akt 信号通路持续活化及群司珠单抗耐药。本研究通过转基因技术增加群司珠单抗耐药性细胞株内 *PTEN* 蛋白的表达水平,阻断 Akt 的磷酸化使持续活化的 PI3K/Akt 信号通路失活,从而逆转肿瘤细胞耐药。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

质粒 pcDNA3.0 *PTEN* cDNA、pCA13、pJM17 由第二军医大学微生物教研室提供。人胚肾 293 细胞、人群司珠单抗耐药性乳腺癌细胞株 BT474 由第二军医大学东方肝胆外科研究所提供。雌性 3 周龄 BALB/c 裸小鼠购于第二军医大学动物实验中心 [ SCXK(沪)2002-0006 ]。群司珠单抗由上海罗氏公司惠赠。兔抗人 *PTEN* 单克隆抗体、丝氨酸/苏氨酸激酶( Akt )单克隆抗体及 S473 磷酸化多克隆抗体购于 Chemicon 公司。DMEM 培养基购于 Gibco 公司。MTT 粉剂、X-gal 母液、PI 粉剂购于 Sigma 公司。羊抗兔 IgG-AP、IgG-HRP、二氨基联苯胺盐酸盐( DAB )购于华美生物工程公司。RNA 抽提试剂盒和 NBT/BCIP 购于华舜生物制品有限公司。*PTEN* cDNA 引物 1: 5'-GCAAGCTTGTGACAGCCATCATCAAAG-3'; 引物 2: 5'-GCGGATCCCCTCCAATTCAGGACCCAC-3'由上海生工公司合成。

### 1.2 pCA13 *PTEN* cDNA 腺病毒载体的构建

用引物 1 和引物 2 从 pcDNA3.0 *PTEN* cDNA 中扩增 *PTEN* 基因,在其 5' 端引入 *Hind* III 酶切位

点,3'端引 *Bam*H I 酶切位点得到 1 210 bp *PTEN* 基因片段,克隆到 pMD-18-T 载体,用 M13 引物对 pMD18-T-*PTEN* cDNA 进行测序。测序正确后,用 *Hind* III/*Bam*H I 将 *PTEN* 片段从 pMD18-T-*PTEN* 上游游离下来,用 *Hind* III/*Bam*H I 酶切 pCA13 载体,在 T4DNA 连接酶作用下,将线性化的 pCA13 与 *PTEN* 片段进行连接;用 *Hind* III/*Bam*H I 酶切鉴定阳性克隆,用 *Hind* III + *Bam*H I、*Bgl* II、*Sac* I 酶切鉴定 *PTEN* 基因被正确克隆到 CMV 启动子下游,确认基因的开放阅读框正确。

### 1.3 同源重组携带 *PTEN* 基因的重组腺病毒

pCA13 *PTEN* 与 pJM17 由脂质体介导共转染 293 细胞进行同源重组,第 14 天收集细胞,制备病毒裂解液进行筛选。24 孔板培养 293 细胞和 HeLa 细胞,取病毒裂解液,每份标本在 2 孔 293 细胞和 1 孔 HeLa 细胞中各加 50  $\mu$ l 与 100  $\mu$ l 5% FCS/DMEM,感染 4 h,加 500  $\mu$ l DMEM 培养 72 h,HeLa 细胞无 CPE 而 293 细胞出现 CPE 的克隆为携带 *PTEN* 基因的复制缺陷型重组腺病毒 Ad*PTEN*。取病毒裂解液,应用 *PTEN* 基因引物 1 和引物 2 行 PCR 扩增鉴定。大量扩增阳性克隆,氯化铯梯度离心纯化,TCID<sub>50</sub> 法测定滴度。同法制备对照病毒 AdLacZ。

### 1.4 腺病毒体外感染效率的测定

BT474 细胞以  $5 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板培养至 80% 融合,加入不同感染复数( MOI = 20, 40, 60, 80, 100, 200 ) AdLacZ 稀释液 500  $\mu$ l,感染 4 h,再加入 2.5 ml 完全培养液培养 48 h 后行 X-gal 染色;显微镜下随机挑取 3 个高倍视野,分别计算蓝染细胞占视野中所有细胞的百分数,取均值代表转导效率。

### 1.5 Western blotting 检测重组腺病毒感染 BT474 后 *PTEN* 蛋白的表达

用 MOI = 100 的 Ad*PTEN* 感染 BT474, 48 h 后分别抽提总 DNA 和总 RNA,用引物 1、引物 2 行 PCR 及 RT-PCR 扩增。Ad*PTEN* 感染 BT474 细胞 4 h,换用 2% DMEM 继续培养 72 h,分别于 24、48、72 h 裂解细胞,收集上清行 Western blotting 分析 *PTEN* 蛋白的表达:细胞裂解液上清 12% SDS-PAGE

电泳分离;转膜、封闭、兔抗人 *PTEN* 单克隆抗体 4 °C 过夜;羊抗兔 Ig-HRP 37 °C 孵育 1 h;DAB 显色。

### 1.6 MTT 法检测 Ad*PTEN* 感染对 BT474 细胞增殖的影响

BT474 细胞接种于 96 孔板,每孔  $5 \times 10^3$  个,培养基中群司珠单抗浓度为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。将细胞分为群司珠单抗组 + PBS 组、Ad*PTEN* + 群司珠单抗组和 AdLacZ + 群司珠单抗组。用相应腺病毒感染 4 h,再加入培养液继续培养,第 3、第 5 天更换培养液。以感染当天为第 0 天,MTT 比色法分别检测第 1~6 天细胞的 *D* 值,绘制生长曲线。

### 1.7 PI 单染 FCM 检测 Ad*PTEN* 感染对 BT474 细胞凋亡的影响

BT474 细胞 1:3 传代,每瓶约  $1 \times 10^6$  个。待生长至 60% 汇合后,分组同 1.6。用 Ad*PTEN* 或 AdLacZ 感染细胞 4 h 后继续培养 48 h,DMEM 培养基作空白对照。收集细胞,70% 乙醇 4 °C 固定 1 h;PI 溶液 4 °C 避光染色 30 min;流式细胞仪检测。

### 1.8 DNA 片段化实验分析 Ad*PTEN* 感染诱导 BT474 细胞的凋亡

分组同 1.6,  $5 \times 10^5$  个 BT474 细胞用 Ad*PTEN* 或 AdLacZ 感染 4 h 后继续培养,分别取感染后 12、24、36 和 48 h 的细胞用 40  $\mu\text{l}$  PC 缓冲液重悬,37 °C 静置 1 h;离心后取上清真空浓缩;加入 0.25% NP-40 溶液 3  $\mu\text{l}$  和 1 mg/ml RNaseA 溶液 3  $\mu\text{l}$ ,37 °C 静置 30 min;加入 3  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K,37 °C 静置 30 min;加入 12  $\mu\text{l}$  样品稀释液上样于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 6 h,以完全培养基作空白对照。

### 1.9 Ad*PTEN* 感染对 BT474 细胞中 Akt 磷酸化水平的影响

Ad*PTEN* 和 AdLacZ 感染 BT474 细胞、培养基作空白对照。继续培养 48 h;收获各组感染细胞,加细胞裂解液冰浴 30 min,12% SDS-PAGE 电泳;转膜;洗膜;封闭;丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)S473 磷酸化多克隆抗体 4 °C 过夜;羊抗兔 Ig-AP 孵育 1 h;膜与 BCIP/NBT 避光呈色 1 h。

### 1.10 Ad*PTEN* 重组腺病毒对荷乳腺癌裸鼠的治疗实验

12 只 3 周龄 BALB/c 雌性裸小鼠,背部皮下以  $1 \times 10^7$ /只 BT474 细胞接种,成瘤后随机分 3 组:群司珠单抗组 + PBS 组、群司珠单抗 + AdLacZ 组和群司珠单抗 + Ad*PTEN* 组。治疗组第 10 天开始肿瘤内直接注射 250  $\mu\text{l}$  Ad*PTEN*( $10^9$  PFU) + 250  $\mu\text{l}$  群司珠单抗(0.2  $\mu\text{mol/l}$ ),隔日 1 次,共 10 次;对照组注射等量 AdLacZ 或 PBS。隔日测量肿瘤体积。

末次注射后 24 h,颈椎脱臼法处死裸鼠,剥离瘤体,测量肿瘤长短径计算肿瘤体积及抑瘤率。

### 1.11 免疫组化检测移植瘤组织 *PTEN* 蛋白表达

移植瘤组织常规切片,脱蜡,抗原修复,过氧化物酶阻断内源性过氧化物酶的活性;加非免疫性动物血清,室温下孵育 10 min;加兔抗人 *PTEN* 单体、4 °C 过夜,加羊抗兔 IgG-HRP,室温下孵育 30 min, DAB 显色后苏木素复染,镜检,拍照。

### 1.12 TUNEL 法检测移植瘤细胞的凋亡

切片脱蜡,加入 20 ng/ml 蛋白酶 K 37 °C 下消化 20 min,1 mmol/L 甘氨酸-PBS 清洗两次,每次 5 min;加入 30  $\mu\text{l}$  的 TUNEL 液,37 °C 60 min;加 1:500 DIG 抗体 37 °C 60 min;0.05% DAB + 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  显色,苏木精衬染,乙醇洗涤,封片,镜检。

### 1.13 电镜观察移植瘤组织的超微结构

将肿瘤组织切成 1  $\text{cm}^3$  大小,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗 2~3 h;1% 锇酸固定 2 h,酒精脱水;环氧树脂与 Epon812 包埋;45 °C、60 °C 各聚合 24 h;50 nm 超薄切片;2 管 12 ml 柠檬酸铅染液 3 800  $\times g$  离心 30 min;吸取中层醋酸铀注入染盒,避光染色 20 min;倾去染液用 50% 乙醇洗涤数次,吸硝酸铅染液注入,避光染色 20 min,弃染液,冲洗,快速吸干水分,取出铜网置洁净滤纸中,镜检。

### 1.14 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行组间 *t* 检验或卡方检验。

## 2 结 果

### 2.1 重组腺病毒 Ad*PTEN* 的成功制备

重组腺病毒酶切鉴定如图 1 所示。TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度为  $4.2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/ml。重组腺病毒 Ad*PTEN* 经 PCR 鉴定证实 *PTEN* 基因存在。

### 2.2 重组腺病毒 Ad*PTEN* 的感染效率

当 MOI = 100 时,AdLacZ 感染效率达 100%(图 2),表明重组腺病毒能有效地将外源基因转移到 BT474 细胞中,MOI = 100 为最适感染值。

### 2.3 Ad*PTEN* 感染后 BT474 细胞中 *PTEN* 的表达

以感染细胞总 DNA 和 cDNA 为模板,用 *PTEN* 基因扩增引物行 PCR 及 RT-PCR,结果均有 1 210 bp 的扩增带(图 3)。Western blotting 同样检测到相对分子质量 60 000 的 *PTEN* 蛋白条带,证实了重组腺病毒可将 *PTEN* 基因转导进 BT474 细胞中,并得到正确的转录和表达(图 4)。

### 2.4 Ad*PTEN* 感染对耐药性乳腺癌细胞在群司珠单抗作用下增殖的影响

AdPTEN 感染 BT474 细胞 24 h 后大部分细胞变圆, 生长受到明显抑制, 72 h 以后多数细胞凋亡; 而 AdLacZ 组细胞 4 d 已 100% 汇合。生长曲线显示 AdLacZ 组和 PBS 组增殖速度无显著差异 ( $P > 0.05$ ), AdPTEN 组细胞增殖速度较两对照组明显减慢 ( $P < 0.01$ ), 72 h 抑制率约为 57.34%。说明 AdPTEN 感染可以增加 BT474 细胞对群司珠单抗的敏感性, 细胞增殖受到明显抑制; 而 AdLacZ 感染并不能改变细胞耐药性, 因而不影响细胞增殖(图 5)。

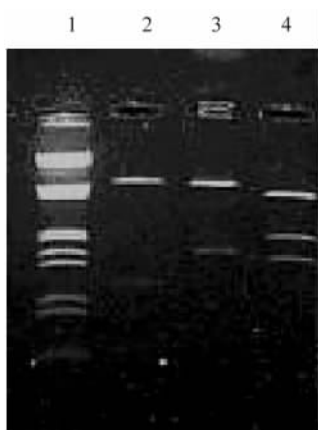


图 1 pCA13 PTEN 穿梭质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pCA13 PTEN vector by restriction enzyme digestion

1:  $\lambda$ DNA/ *EcoR* I + *Hind* III marker; 2: 1 210 bp PTEN cDNA( *Hind* III + *Bam* H I ); 3: 1 649 bp CMV + PTEN cDNA + SV40AN( *Bgl* II ); 4: 1 530 bp PTEN cDNA + SV40AN( *Sac* I )

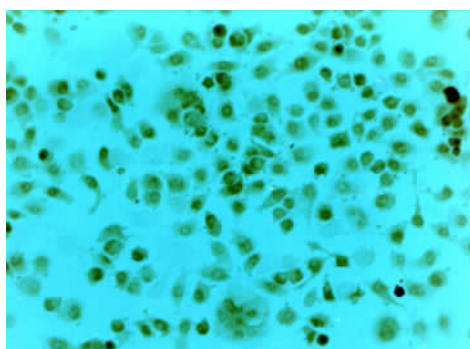


图 2 X-gal 染色检测腺病毒 AdLacZ

( MOI = 100 )对 BT474 细胞的感染 (  $\times 200$  )

Fig. 2 X-gal staining for detecting infection of BT474 cells by AdLacZ( MOI = 100 ) (  $\times 200$  )

2.5 AdPTEN 感染对群司珠单抗作用下耐药性乳腺癌细胞周期的影响

感染 AdPTEN 和 AdLacZ 的 BT474 细胞增殖周

期的分析结果(表 1)显示: AdPTEN 感染组出现明显的凋亡峰, 且与 AdLacZ 组或对照组相比  $G_1$  期细胞明显增多, S 期细胞明显减少, 差异有统计学意义 ( $F = 81.56, P < 0.01$ ), AdLacZ 组和对照组相比各阶段细胞组成比例差异无统计学意义。

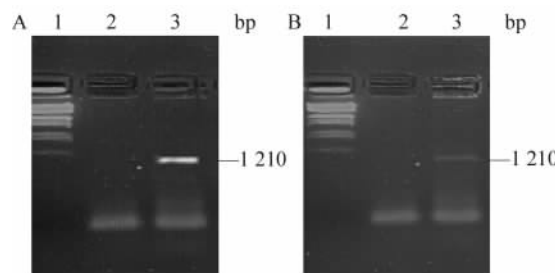


图 3 AdPTEN 感染的 BT474 细胞中 PTEN 基因表达的 PCR ( A ) 及 RT-PCR ( B ) 鉴定

Fig. 3 Identification of PTEN gene expression in BT474 cells infected with AdPTEN by PCR ( A ) and PCR ( B )

1:  $\lambda$ DNA *Hind* III / *EcoR* I marker; 2: PCR product of BT474 cells infected with AdLacZ; 3: PCR product of BT474 cells infected with AdPTEN

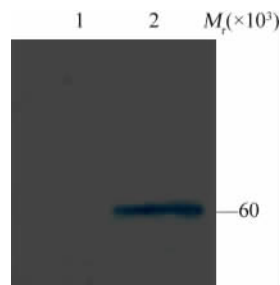


图 4 AdPTEN 感染的 BT474 细胞中 PTEN 蛋白表达的 Western blotting 检测

Fig. 4 Expression of PTEN protein in BT474 cells infected with AdPTEN by Western blotting

1: BT474 cells infected with Ad LacZ; 2: BT474 cells infected with AdPTEN

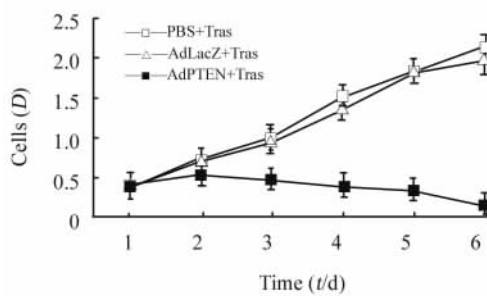


图 5 AdPTEN 感染后耐药性乳腺癌 BT474 细胞在群司珠单抗作用下的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of BT474 cells infected by AdPTEN and Ad LacZ with trastugumab( tras ) treatment

表 1 AdPTEN 感染对群司珠单抗作用下的 BT474 细胞周期和凋亡的影响( % )

Tab.1 Effect of AdPTEN infection on cells cycle and apoptosis of BT474 under trastugumab ( Tras ) treatment( % )

Group	Apoptosis rate	Cell cycle		
		G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	S
AdPTEN + Tras	20.70 ± 5.82*	67.35 ± 3.81*	9.93 ± 2.88	22.74 ± 4.52*
AdLacZ + Tras	2.25 ± 1.25	49.34 ± 3.54	9.54 ± 6.21	40.30 ± 7.47
PBS + Tras	2.83 ± 1.63	50.21 ± 3.81	9.98 ± 5.28	40.10 ± 7.89

\*  $P < 0.01$  vs Ad LacZ group or control

## 2.6 DNA 片段化分析验证耐药性乳腺癌细胞凋亡

AdLacZ 感染组及对照组细胞 DNA 基本无裂解, AdPTEN 感染组细胞发生典型的 DNA 片段化现象(图 6), 并以感染后 24 ~ 36 h 最为明显。说明此时蛋白表达达到最高峰, 凋亡发生率最高; 而时间延长, 大量细胞发生坏死, DNA 梯形条带不明显。

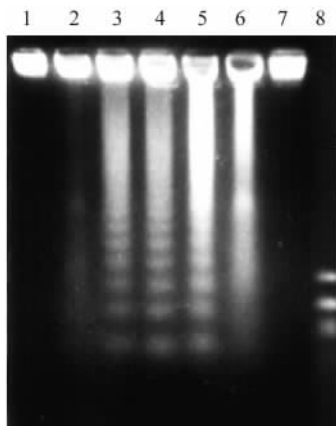


图 6 AdPTEN 感染诱导群司珠单抗作用下 BT474 细胞凋亡的 DNA 片段化分析

Fig.6 DNA fragmentation of apoptotic BT474 cells induced by recombinant Ad PTEN under trastugumab treatment

1-2: DNA extract from BT474 cells after infected with AdLacZ 24 h and 48 h; 3-6: DNA extract from BT474 cells after infected with AdPTEN 12, 24, 36, 48 h respectively; 7: PBS; 8: Marker

## 2.7 AdPTEN 感染对乳癌 BT474 细胞中 Akt 磷酸化水平的影响

AdPTEN 感染后继续培养 48 h; 收获两对照组及 AdPTEN 感染细胞行 Western blotting 检测发现, AdPTEN 感染细胞中 Akt 磷酸化水平较 AdLacZ 组或对照组明显降低(图 7)。

## 2.8 AdPTEN 治疗裸鼠乳腺癌转移瘤的效果

荷瘤裸鼠经 AdPTEN + 群司珠单抗治疗 20 d 后, 瘤体积为(396.17 ± 225.43) mm<sup>3</sup> 明显小于 AdLacZ 组(3189.19 ± 893.65) mm<sup>3</sup> 和 PBS 组(3294.64 ± 876.27) mm<sup>3</sup>。两对照组与治疗组间的

肿瘤体积差异具统计学意义(  $F = 432.31$ ,  $P = 0.0005$  ), 抑瘤率为 87.98%。

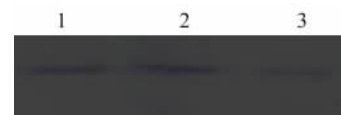


图 7 Western blotting 检测 AdPTEN 感染乳腺癌 BT474 细胞中 Akt 磷酸化的水平

Fig.7 Level of phosphorylated Akt in BT474 cells infected with recombinant Ad PTEN by Western blotting

1: Control; 2: Protein extract from BT474 cells after infection with AdLacZ 48 h; 3: Protein extract from BT474 cells after infection with AdPTEN 48 h

## 2.9 AdPTEN 治疗后移植瘤组织中 PTEN 蛋白的表达

用兔抗人 PTEN 的单克隆抗体行免疫组化染色, 发现在 AdPTEN 治疗的移植瘤组织中检测到 PTEN 蛋白的表达, 证明经 AdPTEN 治疗后 *PTEN* 基因在动物活体内得到了转录、翻译(图 8)。

## 2.10 AdPTEN 治疗组移植瘤细胞的凋亡

TUNEL 法检测结果发现, 治疗组凋亡细胞明显增多, 呈簇状分布, 而 AdLacZ 组和对照组仅有散在分布的凋亡细胞(图 9)。每张切片随机取 5 个高倍视野, 计数视野内阳性染色细胞数和肿瘤细胞总数, 按  $AI(\%) = \text{阳性细胞数} / \text{肿瘤细胞总数} \times 100\%$  计算肿瘤凋亡指数( apoptosis index, AI)。结果显示, 治疗组 AI 为(55.40 ± 6.37)%, 较 AdLacZ 组的(12.05 ± 3.71)% 或对照组的(13.34 ± 5.20)% 明显增多(  $P < 0.01$  )。

## 2.11 AdPTEN 治疗组移植瘤细胞超微结构的改变

AdLacZ 组和对照组细胞无异常发现, 治疗组肿瘤组织中观察到典型的细胞凋亡形态: 核发生碎裂, 在细胞质内可见多个电子密度增强的核碎片, 细胞体积变小, 细胞质浓缩, 其内的细胞器保存较好, 细胞质内可见空泡增多, 细胞膜保持完整(图 10A); 凋亡晚期可见膜包裹的内有较完整的细胞器和细胞

核碎片的凋亡小体(图 10B)。

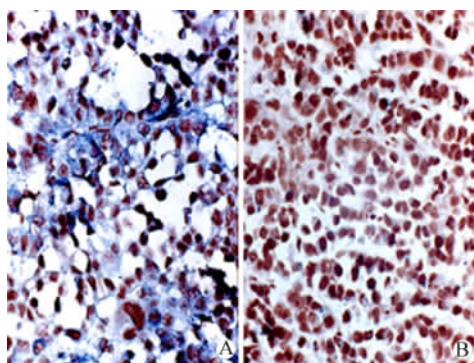


图 8 AdPTEN 治疗组移植瘤中 PTEN 蛋白的表达 (×400)

Fig. 8 Expression of PTEN protein in transplanted tumor after treatment with Ad PTEN( ×400 )

A: AdPTEN treatment group; B: Control group

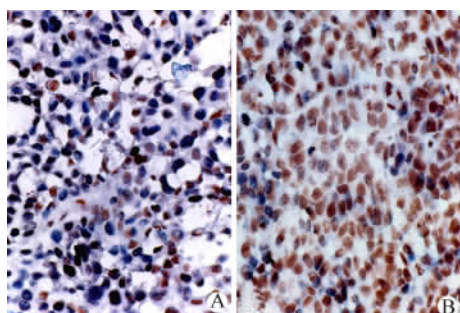


图 9 TUNEL 法检测 AdPTEN 治疗组移植瘤细胞的凋亡情况(×400)

Fig. 9 Apoptosis of transplanted tumor cells after treatment with Ad PTEN by TUNEL staining( ×400 )

A: AdPTEN treatment group; B: Control group

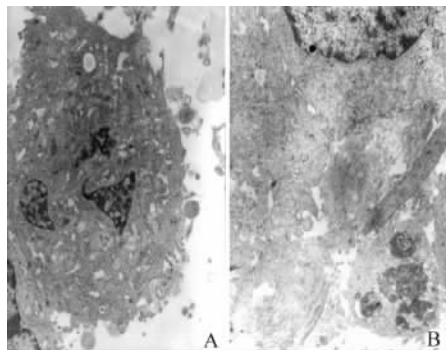


图 10 AdPTEN 治疗后移植瘤细胞的超微结构改变(×12 000)

Fig. 10 Ultrastructure change of transplanted tumor cells after treatment with AdPTEN( ×12 000 )

A: Typical features of apoptosis: such as decreased cell size, chromatin condensation, fragmentation in micronuclei;

B: Apoptosis body repesence

### 3 讨论

HER2 是一种酪氨酸激酶受体,主要是通过自身磷酸化或与 EGFR 家族其他成员结合形成异源二聚体,活化内部的酪氨酸激酶,从而激活下游信号通路,参与调节细胞增殖、分化、凋亡;其参与调节的下游信号通路主要有 PI3K/Akt 及 Ras/MAPK 信号通路。目前认为其促进细胞生长活性和增强恶性转化的可能机制是:HER2 作为一种无配体的共同受体,与家族其他成员形成异源二聚体,增强了与相应配体的亲和力,表现出更强的信号转导能力<sup>[5]</sup>。同时,HER2 可抑制 C-Cb1 调节的 HER1 内吞降解作用,使 HER1 从细胞膜内吞后,不能与 C-Cb1 偶联和被溶酶体降解,而是重新回到细胞膜,以 HER1/HER2 异源二聚体形式反复发挥信号传导作用。此外,HER2 还可通过下调细胞周期抑制剂 p27 和 p130,诱导肿瘤细胞对宿主防御机制耐受和增强新生血管生成而发挥作用。

群司珠单抗的主要作用机制是特异结合于 HER2 受体胞外段,阻断 HER2 同源二聚体的组成性激活并干扰 HER2 与 EGFR 家族其他成员结合;介导 HER2 受体内吞作用和在被溶酶体内降解,阻断 HER2 再循环到胞膜的过程,加速 HER2 蛋白的旁路降解,从而抑制 HER2 对肿瘤细胞向恶性表型的转导<sup>[6-7]</sup>。因此推测导致群司珠单抗耐药的机制可能有以下几个方面<sup>[8-9]</sup>:(1)细胞表面蛋白(如黏蛋白 MUC4)位阻 HER2 受体导致群司珠单抗无法有效与 HER2 结合;(2)Her2/neu 基因突变,影响群司珠单抗的疗效;(3)HER2 下游 PI3K/Akt 及 Ras/MAPK 信号通路由于其他因素而持续活化。

研究<sup>[10]</sup>显示,群司珠单抗耐药细胞株 BT474 表面 EGFR 家族受体 HER1、HER2、及 HER3 表达和结构以及磷酸化水平与敏感株无差异;而在群司珠单抗作用下 HER2 下游的 PI3K/Akt 信号通路仍然持续活化,因此 PI3K/Akt 信号通路的持续活化是引发耐药的重要机制,也是很好的靶点。导致信号通路持续活化的原因很多,如 PTEN 基因失活;瘤细胞通过膜表面其他受体旁路激活 HER2 的下游信号通路<sup>[11-12]</sup>;ErbB 受体酪氨酸激酶反馈抑制物功能失调<sup>[13]</sup>;p27kip1 水平下降而 cdk2 活性增强<sup>[14]</sup>;胰岛素样生长因子 I 型受体(IGF-IR)通路过度活化<sup>[15]</sup>等。由于 PTEN 功能缺失会导致 PI3K/Akt 信号通路持续活化,并且临床上也发现群司珠单抗对 PTEN 表达降低的乳腺癌患者的疗效较 PTEN 正常者差<sup>[16-17]</sup>,推测增加 PTEN 表达可能逆转细胞对群

司珠单抗的耐药性。

本研究通过腺病毒介导的转基因技术将野生型 *PTEN* 基因感染入耐药株乳腺癌细胞 BT474 内, 从 DNA、mRNA 及蛋白水平分别证实外源性 *PTEN* 基因获得稳定高效的表达。体外实验显示 Ad*PTEN* 联合群司珠单抗治疗抑制 BT474 增殖, 诱导凋亡, 与 AdLacZ 组和对对照组相比差异显著; DNA 片段化实验显示, 在感染组细胞 DNA 出现典型的梯形条带, 尤以感染后 24 ~ 36 h 最为明显, 这与 *PTEN* 表达高峰时间相符, 说明 *PTEN* 逆转了细胞的耐药性。裸鼠移植瘤体内实验显示联合治疗组肿瘤生长受到强烈抑制, 体积抑瘤率高达为 87.98%; 肿瘤组织 TUNEL 试验和电镜观察进一步验证了肿瘤细胞凋亡; 移植瘤组织中 *PTEN* 蛋白表达明显增加。

*PTEN* 参与细胞凋亡调控主要依赖其脂质磷酸酶的活性。*PTEN* 作用于 Akt/ PKB 信号转导通路的中心环节, 使 PIP2 向 PIP3 的转化发生逆转, PIP3 浓度维持在较低水平, 从而抑制了 PI3K 的磷酸化作用, 阻断了 Akt 及其下游激酶的活性, 引起细胞凋亡。本实验证实 Ad*PTEN* 感染明显下调 BT474 乳癌细胞内 Akt 的磷酸化水平, 提示 *PTEN* 通过阻断 Akt 的磷酸化水平和 Akt kinase 的活性, 使 BT474 内持续活化的 PI3K/Akt 信号通路失活, 从而逆转了群司珠单抗耐药。本研究仅仅是一种逆转群司珠单抗耐药治疗的尝试, 只有进一步了解群司珠单抗的作用机制和耐药机制, 才能找到理想的预测群司珠单抗疗效的生物学指标。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab ( Herceptin )-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase ( PI-3K ) and epidermal growth factor receptor ( EGFR ) kinase inhibitors [ J ]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91( 2 ): 187-201.
- [ 2 ] Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, *et al.* Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62( 14 ): 4132-4141.
- [ 3 ] Pandolfi PP. Breast cancer-loss of *PTEN* predicts resistance to treatment [ J ]. *N Engl J Med*, 2004, 351( 22 ): 2337-2338.
- [ 4 ] Fujita T, Doihara H, Washio K, *et al.* Proteasome inhibitor bortezomib increases *PTEN* expression and enhances trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumab-resistant cells [ J ]. *Anti-cancer Drugs*, 2006, 17( 4 ): 455-462.
- [ 5 ] Lohrish C, Piccart M. An overview of HER2 [ J ]. *Semin Oncol*, 2001, 28( 6 Suppl 18 ): 3-11.
- [ 6 ] Lan KH, Lu CH, Yu D. Mechanisms of trastuzumab resistance and their clinical implications [ J ]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1059: 70-75.
- [ 7 ] Nahta R, Yu D, Hung MC, *et al.* Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer [ J ]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, 3( 5 ): 269-280.
- [ 8 ] Nagy P, Friedlander E, Tanner M, *et al.* Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 2 ): 473-482.
- [ 9 ] Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, *et al.* HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors [ J ]. *Cancer Cell*, 2006, 10( 1 ): 25-38.
- [ 10 ] Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer [ J ]. *Oncogene*, 2007, 26( 9 ): 1338-1345.
- [ 11 ] Xia W, Bisi J, Strum J, *et al.* Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 3 ): 1640-1647.
- [ 12 ] Robinson AG, Turbin D, Thomson T, *et al.* Molecular predictive factors in patients receiving trastuzumab-based chemotherapy for metastatic disease [ J ]. *Clin Breast Cancer*, 2006, 7( 3 ): 254-261.
- [ 13 ] Anastasi S, Sala G, Huiping C, *et al.* Loss of RALT/MIG-6 expression in ERBB2-amplified breast carcinomas enhances ErbB-2 oncogenic potency and favors resistance to Herceptin [ J ]. *Oncogene*, 2005, 24( 28 ): 4540-4548.
- [ 14 ] Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, *et al.* P27( kip1 ) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64( 11 ): 3981-3986.
- [ 15 ] Nahta R, Yuan LX, Zhang B, *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 23 ): 11118-11128.
- [ 16 ] Nagata Y, Lan KH, Zhou X, *et al.* *PTEN* activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of *PTEN* predicts trastuzumab resistance in patients [ J ]. *Cancer Cell*, 2004, 6( 2 ): 117-27.
- [ 17 ] Smith I, Procter M, Gelber RD, *et al.* 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial [ J ]. *Lancet*, 2007, 369( 9555 ): 29-36.

[ 收稿日期 ] 2008 - 07 - 23

[ 修回日期 ] 2008 - 08 - 26

[ 本文编辑 ] 韩 丹