

日蟾蜍它灵通过 HSP90/突变 p53 途径抑制三阴性乳腺癌细胞增殖

肖沛, 李美玲, 周建林, 周畅*

(湖南师范大学 生命科学学院 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)恶性程度高, 预后差, 其 p53 基因的突变频率达 80% 以上。日蟾蜍它灵(gamabufotalin, CS-6)是日本蟾蜍的皮肤分泌物, 有研究表明 CS-6 具有抗癌作用, 但其对 TNBC 的作用和机制尚无报道。本文采用 MTT 法和细胞克隆形成实验检测了不同浓度 CS-6 对 TNBC 细胞系 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖的影响; 采用 Western-blot 检测了 CS-6 在外源和内源水平对 p53 和热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)表达水平的影响; 采用联合指数及等效线分析法考察了 CS-6 和 HSP90 的抑制剂坦螺旋霉素(tanespimycin, 17-AAG)对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖的协同作用。结果显示, CS-6 明显抑制 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞的增殖, 其抑制增殖机制有可能与降解 HSP90/突变 p53 有关; 而且, CS-6 和 HSP90 抑制剂 17-AAG 联合用药对抑制 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖具有协同作用。

关键词: 日蟾蜍它灵(CS-6); 三阴性乳腺癌(TNBC); p53 蛋白; 热休克蛋白 90 (HSP90); 联合用药

中图分类号: Q25, R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0217-06

Gamabufotalin Inhibits the Proliferation of Triple Negative Breast Cancer Cells Through HSP90/mutant p53 Pathway

XIAO Pei, LI Meiling, ZHOU Jianlin, ZHOU Chang*

(State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Triple negative breast cancer (TNBC) is a highly malignant tumor with a poor prognosis, and the mutation frequency of p53 gene in TNBC patients is more than 80%. Gamabufotalin (CS-6), a skin secretion from Japanese common toad (*Bufo japonicus*), has been shown to have anticancer effects. However, the role and underlying mechanism of CS-6 against TNBC have not been reported. Herein, the effects of different concentrations of CS-6 on the proliferation of TNBC cell lines MDA-MB-468 and MDA-MB-231 were detected by MTT assay and clone formation assay. The effects of CS-6 on the expression of p53 and heat shock protein 90 (HSP90) at exogenous and endogenous levels were detected by Western-blot. The synergistic effect of CS-6 and the HSP90 inhibitor tanespimycin (17-AAG) on the proliferation of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells was investigated by combination index and equivalent linearization analysis. The results showed that CS-6 significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells. The mechanism of inhibition of the tumor cell proliferation may be related to degradation of HSP90/mutant p53 protein. In addition, CS-6 and HSP90 inhibitor 17-AAG had a synergistic inhibitory effect on the proliferation of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells.

Key words: gamabufotalin (CS-6); triple negative breast cancer (TNBC); p53 protein; heat shock protein 90

收稿日期: 2022-11-04; 修回日期: 2022-12-04; 网络首发日期: 2022-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82070155); 长沙市自然科学基金项目(kq2202249)

作者简介: 肖沛(1998-), 男, 湖南株洲人, 硕士研究生; *通信作者: 周畅(1972-), 女, 湖南长沙人, 博士, 教授, 主要从事医学遗传学研究, E-mail: zhouc@hunnu.edu.cn

(HSP90); drug combination

2020年的统计数据显示,在女性恶性肿瘤中乳腺癌以230万新发病例超过肺癌成为最常见的癌症^[1]。根据雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)这3种分子标记的表达,乳腺癌可分为4种亚型: luminal A型、luminal B型、HER2过表达型和三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)^[2]。其中, TNBC发生率占总乳腺癌的约15%^[3]。TNBC是指ER、PR和HER2表达均为阴性的乳腺癌,其恶性程度高,侵袭性强,容易出现局部复发和远端转移^[3]。因为TNBC具有高异质性、侵袭性,并缺乏治疗选择,化疗仍然是其治疗的主要方法^[4],但不幸的是,大多数TNBC患者由于在治疗期间变得耐药或本质上不太易感,经常产生耐药性^[5],目前没有很好的治疗靶标。针对癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库的分析显示,在80%的TNBC中肿瘤抑制基因p53(TP53)发生突变^[6]。p53蛋白是一种转录因子,可调节其控制细胞功能的下游靶基因,参与许多庞大生命过程的调控,包括细胞周期停滞、凋亡和细胞衰老^[7]。p53中的大多数错义突变位于DNA结合域内,包括6个常见的“热点”氨基酸密码子(R175、G245、R248、R249、R273和R282)^[8]。很多具有错义突变的p53不仅丧失其正常功能,而且表现出功能获得(gain of function, GOF),即突变型p53获得致癌的新功能^[9],可促进肿瘤生长、基因组不稳定性、侵袭、化疗耐药性,并改变多种蛋白质组和代谢途径^[10]。

日蟾蜍它灵(gamabufotalin, CS-6)是日本蟾蜍(*Bufo japonicus*)的一种皮肤分泌物,分子式为C₂₄H₃₄O₅,相对分子质量为402.52,熔点254℃,呈白色粉末状,可溶于有机溶剂,如二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。前期有文献报道,CS-6不仅能够抑制骨肉瘤细胞的活力和肿瘤发生能力^[11],还能抑制血管生成^[12]。热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)是一种分子伴侣蛋白,对突变p53蛋白的稳定性十分重要,有文献表明,HSP90与突变p53相互作用可以使突变p53免受内源性鼠双微粒体2(murine double minute2, MDM2)的E3泛素连接酶的降解^[13]。同时,有研究报

(*Life Science Research*, 2023, 27(3): 217-222)

道,CS-6能够抑制肺癌中HSP90的表达^[14],从而达到抑制肺癌细胞生长的目的。但关于CS-6对TNBC的影响及可能的分子调控机制目前尚未见报道。

本研究以TNBC细胞系MDA-MB-468和MDA-MB-231为研究对象,探究CS-6对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞增殖的影响以及潜在的分子机制,并在此基础上,进一步分析CS-6和HSP90抑制剂坦螺旋霉素(tanespimycin, 17-AAG)联合用药对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞增殖的影响,以寻找最佳联合方案,为TNBC治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株来自于本实验室保种的*E.coli* TOP10和*E.coli* BL21; HA-p53R273H、HA-p53L194F和Flag-HSP90AB1质粒为实验室之前构建。CS-6(10 mg,纯度为99.96%)和HSP90抑制剂17-AAG(10 mg,纯度为99.07%)源自美国MedChemExpress公司;胎牛血清、DMEM培养基购自赛澳美细胞技术有限公司(CellMax);PVDF膜源自美国Millipore公司。HA-tag/p53抗体源自美国Cell Signaling Technology公司;β-actin/HSP90/Flag抗体、二抗goat anti-rabbit/goat anti-mouse购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。转染实验所需的Lipofectamine 2000试剂源自美国Thermo Fisher公司;DNA和蛋白质上样时所用的缓冲液、蛋白质标记(marker)源自美国Thermo Fisher公司;超敏ECL化学发光显影液购自碧云天生物技术有限公司(Beyotime)。DMSO和其他常规试剂购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 细胞系及其培养

人胚胎肾细胞系HEK293和乳腺癌细胞系MDA-MB-468、MDA-MB-231均购于武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞培养按ATCC公司说明书进行。

1.3 细胞转染

细胞密度达到70%左右时进行转染。在离心管中分装好转染试剂Lipofectamine 2000和质粒,静置10 min,随后加入转染细胞中,转染12~24 h。

1.4 MTT 法检测 CS-6 对细胞增殖的影响

将 MDA-MB-231、MDA-MB-468 细胞按照每孔 5 000 个铺到 96 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 摇匀后放于 37 °C 恒温培养箱中培养。待细胞贴壁以后, 将 CS-6 按照 0 nmol/L、1 nmol/L、5 nmol/L、25 nmol/L、125 nmol/L 浓度分别加入到相应组的孔中, 培养 48 h; 随后每个孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μ L, 处理 4 h; 回收废液到废液瓶中后, 每个孔中加入 100 μ L DMSO 溶解 15 min。将样品放进酶标仪中, 选取 490 nm 测定每个孔的光密度值(OD 值, D)。用如下公式计算细胞存活率(R): $R=(D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白对照组}})\times 100\%$ 。运用 GraphPad Prism 7.0 作图分析。

1.5 细胞克隆形成实验检测 CS-6 对细胞生长的影响

一般选用 6 孔板来进行实验, 每孔 1 500 个细胞, 3 个重复孔。将所需细胞铺板后, 采用十字法混匀, 放于细胞培养箱中培养; 待细胞贴壁后过夜, 吸去培养液, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤细胞。按照如下标准向细胞中加入用培养基配好的不同浓度的 CS-6: MDA-MB-468 细胞为 9 nmol/L、18 nmol/L, MDA-MB-231 细胞为 15 nmol/L、30 nmol/L。将其放入细胞培养箱中继续培养。两天更换一次培养基, 培养 15~18 d 后, 用 PBS 洗涤 4 次; 甲醛固定 15 min 后, 按照每孔 1 mL 加入结晶紫染液, 染色 15 min; 染色结束后用 PBS 洗去残余染液; 最后, 拍照并在图片中数出克隆数。运用 GraphPad Prism 7.0 作图分析。

1.6 Western-blot 检测蛋白质表达

离心收集细胞, 去上清; 用 PBS 洗涤细胞, 加入 100 μ L 的 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 20 min。在 4 °C 的条件下 14 000g 离心 10 min, 将蛋白质转移到一个新的 EP 管中, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 随后加入 20 μ L 的变性剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS), 105 °C 金属浴处理 10 min 后上样。选取 10%~12% 的分离胶进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。以 β -actin 为内参蛋白质, 用 Flag、HA 抗体及 HSP90、p53 抗体在外源与内源水平检测 CS-6 对 HSP90 和突变 p53 表达水平的影响。

1.7 联合指数及等效线分析法

采用 MTT 法检测联合用药对 MDA-MB-468

和 MDA-MB-231 细胞生长的影响, 每种浓度组合设置 3 个复孔。将计算得到的存活率用联合用药软件 CompuSyn 进行分析, 得到的等效线图是基于 17-AAG 与 CS-6 的计量反应曲线, 其中, 在等效线下方的数据点提示药物间有协同作用; 在等效线上的数据点提示药物间属于叠加作用; 在等效线上方的数据点提示药物间有拮抗作用^[5]。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据处理及制图, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CS-6 抑制 TNBC 细胞的增殖和克隆形成

为了检测 CS-6 对 TNBC 细胞增殖的影响, 采用不同浓度的 CS-6 (1 nmol/L、5 nmol/L、25 nmol/L、125 nmol/L) 对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞进行处理, 通过 MTT 法(图 1A)和细胞克隆形成实验(图 1B)检测细胞的增殖情况。结果如图 1 所示, 与空白对照组相比, CS-6 以剂量依赖性抑制 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖与克隆形成。

2.2 CS-6 促进 HSP90 和突变 p53 的降解

由于 80% 的 TNBC 中 $TP53$ 基因发生突变^[6], 且一些突变型表现为获得致癌功能; 而 HSP90 能够稳定突变的 p53 蛋白^[3]。为了确定 CS-6 是否通过抑制 HSP90 表达, 降解 p53 突变蛋白, 从而实现抑制 TNBC 细胞增殖, 我们设计了系列实验。首先, 研究了 HSP90 蛋白对 p53 突变蛋白的影响。在 HEK293 细胞中按照图 2A 所示转染 HA-p53-R273H、HA-p53L194F 和 Flag-HSP90AB1 质粒, 采用 Western-blot 检测细胞中 p53R273H、p53L194F 和 HSP90 的表达水平, 结果显示, HSP90 蛋白能够稳定 p53 突变蛋白 p53R273H 和 p53L194F。然后, 检测了 CS-6 对 HSP90 和突变 p53 表达水平的影响。在 HEK293 细胞中按照图 2B 所示转染 HA-p53R273H、Flag-HSP90AB1 质粒, 并使用不同浓度 CS-6 (25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L) 处理, 结果显示: 在 Flag-HSP90AB1 未转染组, p53 突变蛋白 p53R273H 随着 CS-6 的处理浓度升高而降解; 在 Flag-HSP90AB1 转染组, 当 CS-6 的处理浓度达到 50 nmol/L 时, HSP90 蛋白和 p53 突变蛋白 p53R273H 均有明显降解, 且随着 CS-6 处理浓度增加, 降解越明显。最后, 研究了 CS-6

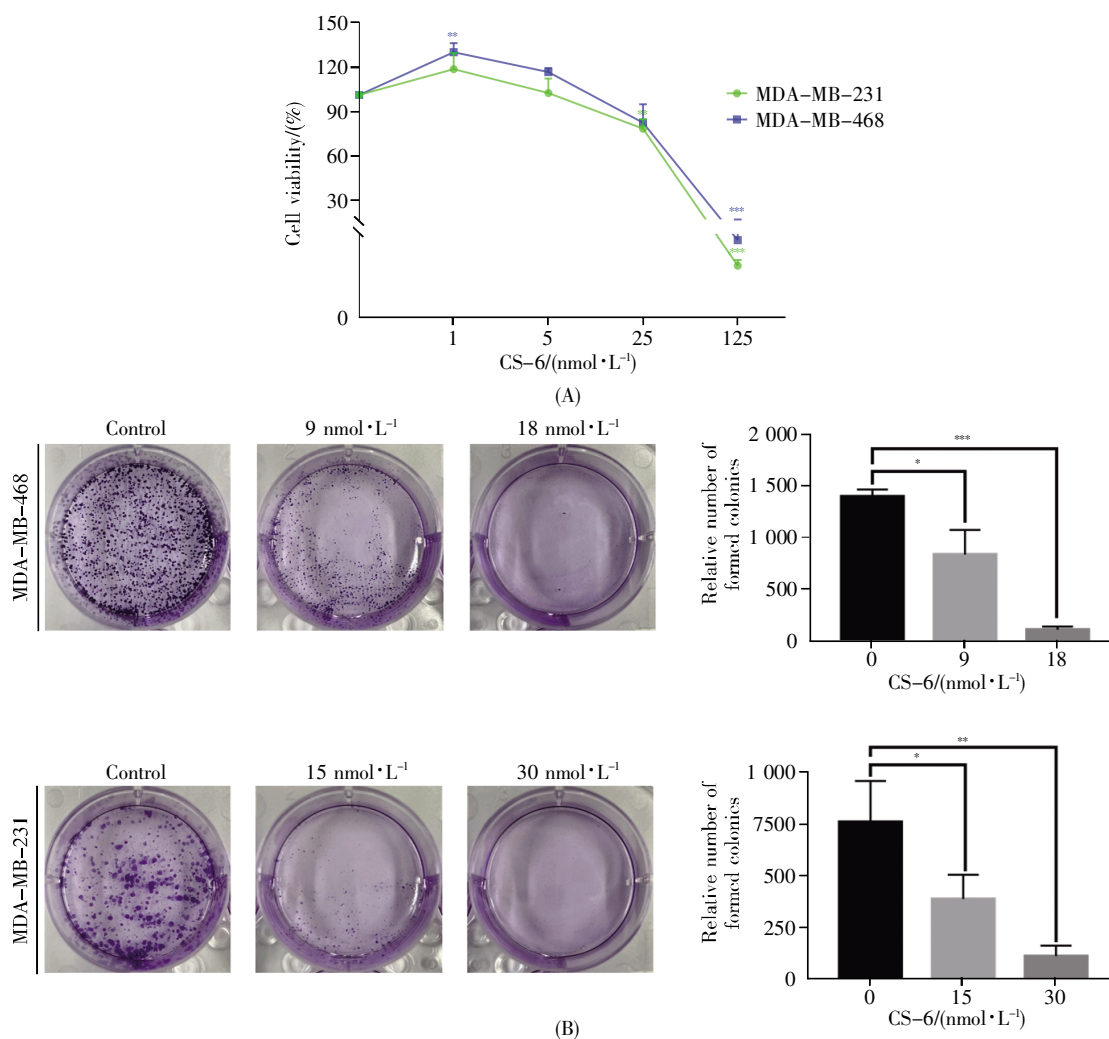


图1 CS-6抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和克隆形成

(A) 不同浓度的CS-6 (1 nmol/L、5 nmol/L、25 nmol/L、125 nmol/L)处理MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞48 h后,采用MTT法检测细胞增殖率;(B)不同浓度的CS-6处理MDA-MB-468细胞(9 nmol/L、18 nmol/L)和MDA-MB-231细胞(15 nmol/L、30 nmol/L) 15~18 d后,用结晶紫染色检测克隆形成数目。数据以3组独立实验得到的平均值±标准差表示;与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;两组间比较采用 t 检验。

Fig.1 CS-6 inhibits the proliferation and colony formation of TNBC cells

(A) The proliferation rate of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells was detected by MTT assay after treatment with different concentrations of CS-6 (1 nmol/L, 5 nmol/L, 25 nmol/L and 125 nmol/L) for 48 h; (B) The number of colony was detected by crystal violet staining after MDA-MB-468 cells were treated with CS-6 at concentrations of 9 nmol/L and 18 nmol/L and MDA-MB-231 cells were treated with CS-6 at concentrations of 15 nmol/L and 30 nmol/L for 15~18 days. Data are expressed as mean ± standard deviation from 3 independent experiments. Compared with blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The t test was used to compare the two groups.

对p53突变的MDA-MB-231细胞中HSP90和突变p53表达水平的影响。图2C的结果表明,CS-6在内源途径对突变p53蛋白也有降解作用。这些结果提示,CS-6抑制TNBC细胞增殖的机制有可能是通过抑制HSP90蛋白表达,从而降解突变p53蛋白,且呈剂量依赖性。

2.3 CS-6和17-AAG协同抑制TNBC细胞增殖

为了探讨17-AAG和CS-6是否能协同抑制MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞增殖,按照

图3A和图3B所示联合用药药物浓度处理MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞,细胞存活率经联合用药软件CompuSyn分析后,得到基于17-AAG和CS-6计量反应曲线的等效线图。结果显示,联合用药在等效线下方(图3),提示药物间有协同作用。

3 讨论

CS-6作为一种日本蟾蜍皮肤分泌物,近些年来被发现能够治疗肿瘤,但具体分子机制还不是

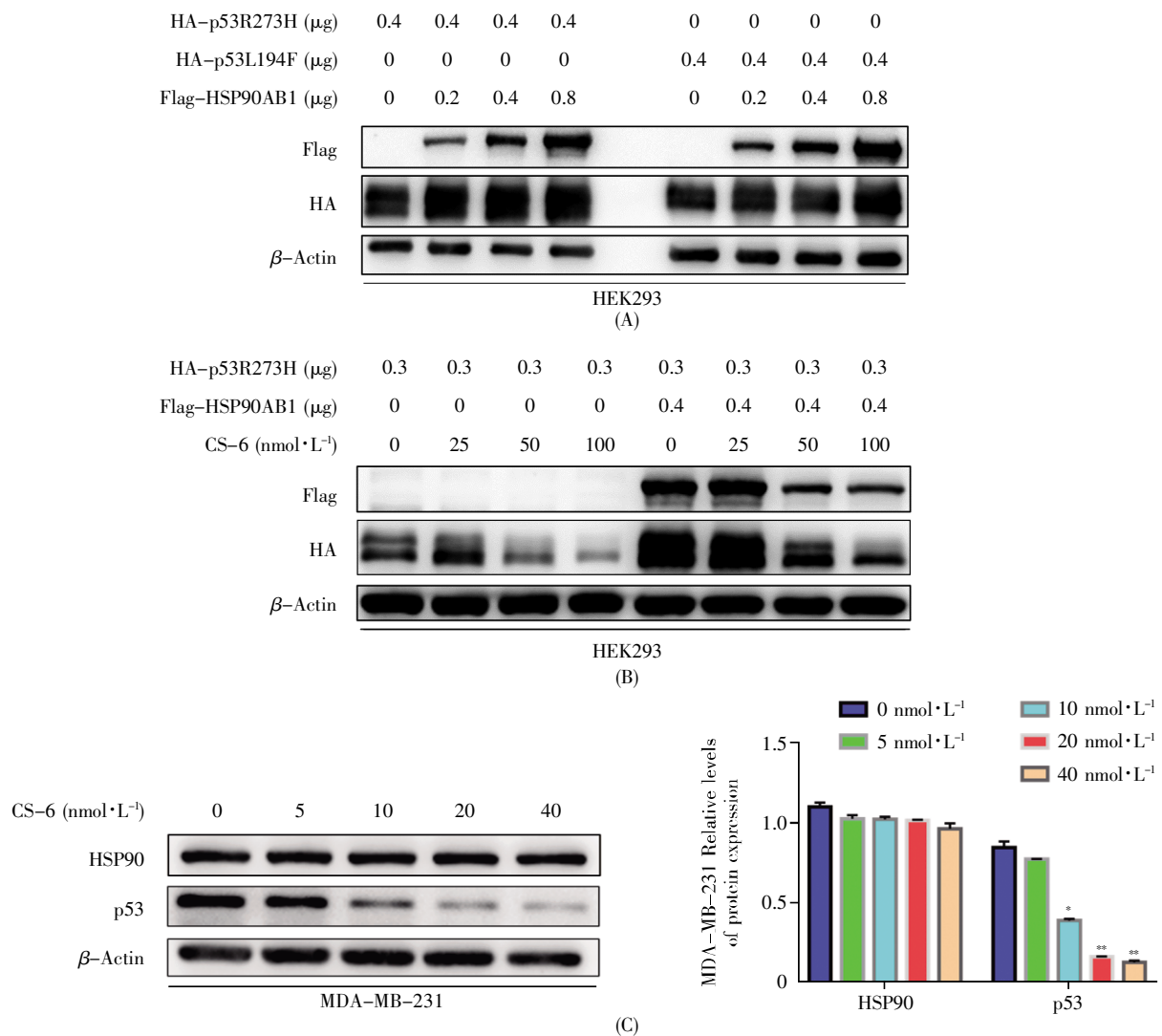


图 2 CS-6 促进 HSP90 和突变 p53 的降解

(A) 转染 HA-p53R273H、HA-p53L194F、Flag-HSP90AB1 质粒 24 h, 采用 Western-blot 检测相关蛋白质表达水平; (B) 转染 HA-p53R273H、Flag-HSP90AB1 质粒 12 h, 随后 CS-6 处理 12 h, 采用 Western-blot 检测相关蛋白质表达水平; (C) 不同浓度(5 nmol/L、10 nmol/L、20 nmol/L、40 nmol/L) CS-6 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 采用 Western-blot 检测 HSP90、p53 蛋白表达水平。数据以 3 组独立实验得到的平均值 \pm 标准差表示; 与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 两组间比较采用 t 检验。

Fig.2 CS-6 promotes degradation of HSP90 and mutant p53

(A) The plasmids HA-p53R273H, HA-p53L194F and Flag-HSP90AB1 were transfected for 24 h, and the expression levels of related proteins were detected by Western-blot; (B) The plasmids HA-p53R273H and Flag-HSP90AB1 were transfected for 12 h, followed by CS-6 treatment for 12 h, and the expression levels of related proteins were detected by Western-blot; (C) The expression levels of HSP90 and p53 were detected by Western-blot after MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations (5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L and 40 nmol/L) of CS-6 for 24 h. Compared with blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The t test was used to compare the two groups.

很清楚。已有研究证明, CS-6 能够抑制骨肉瘤细胞的活力和肿瘤发生能力, 且能抑制血管生成^[11-12]。但在 TNBC 的治疗上, CS-6 的相关研究目前还未见报道。TP53 基因突变或野生型 p53 蛋白的失活往往导致癌症发生^[16]。有研究发现, 小分子化合物可以使突变 p53 的空间构象和折叠方式发生改变, 从而恢复其野生型活性^[17], 但降解突变 p53 蛋白的药物研究还不是很广泛。TCGA 数据库分析显示,

80% 的 TNBC 存在 p53 突变^[6], 而且 TNBC 中这种 p53 突变很多都是获得致癌功能^[18]。目前, TNBC 没有很好的治疗靶点, 主要的治疗方法是化疗^[4], 而化疗容易产生耐药性, 所以急需找到一种靶向药物。有研究报道, CS-6 能够降解 HSP90 蛋白^[14], 而 HSP90 能够稳定突变 p53 蛋白^[13]。基于此, 本研究从 CS-6 对突变 p53 蛋白的影响出发, 探讨了 CS-6 抑制 TNBC 细胞增殖的具体机制, 旨在

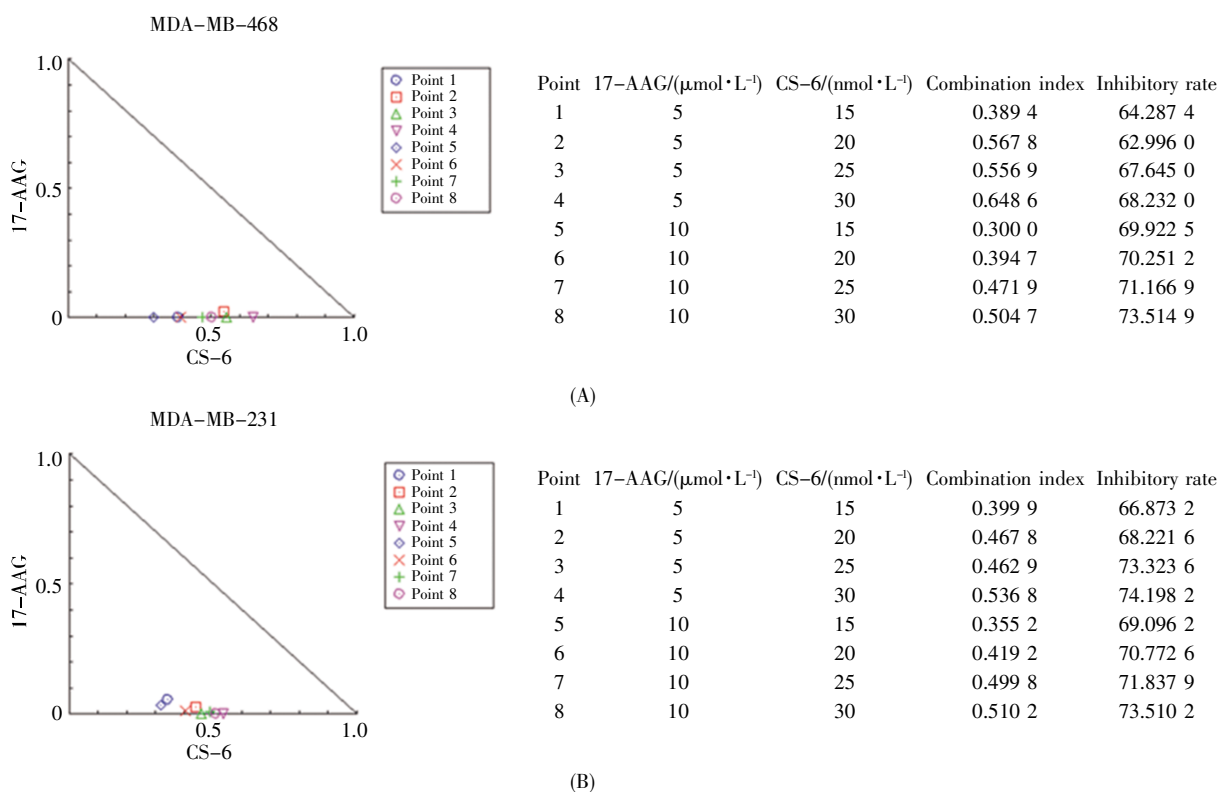


图3 CS-6和17-AAG协同抑制TNBC细胞增殖

(A) 8种17-AAG和CS-6联合用药组合处理MDA-MB-468细胞; (B) 8种17-AAG和CS-6联合用药组合处理MDA-MB-231细胞。

Fig.3 CS-6 and 17-AAG synergistically inhibit the proliferation of TNBC cells

(A) MDA-MB-468 cells were treated with 8 combinations of 17-AAG and CS-6; (B) MDA-MB-231 cells were treated with 8 combinations of 17-AAG and CS-6.

找到一个新的TNBC治疗靶标。

本研究首先检测了CS-6对TNBC细胞增殖的影响。细胞生长曲线结果显示,CS-6对两种细胞增殖有着显著的抑制作用(图1A),说明CS-6能够抑制TNBC细胞增殖。克隆形成实验也得到了同样的结果,即CS-6能抑制MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞的克隆形成(图1B)。由于TNBC细胞的p53突变率很高,而突变的p53往往获得致癌功能,这提示突变的p53可能作为TNBC的治疗靶标。本研究证实HSP90蛋白能够稳定突变p53蛋白(图2A),而文献报道CS-6能够降解HSP90,所以本研究在外源水平进一步探索了CS-6对HSP90蛋白和突变p53蛋白表达水平的影响,结果符合预期,CS-6能够抑制HSP90,促进突变p53的降解,而且呈剂量依赖性(图2B)。与外源检测结果类似,CS-6也能通过抑制HSP90促进MDA-MB-231细胞中突变p53的降解(图2C),从而抑制细胞增殖。这些结果提示突变p53能够作为TNBC的一个潜在治疗靶标。在分子机制基本

明确以后,我们探究了CS-6和17-AAG联合处理对TNBC细胞的影响,发现两种药物对TNBC细胞具有协同抑制作用(图3)。这为TNBC的治疗提供了一个新的联合用药方案,并提示CS-6能够作为一种新的HSP90抑制剂。

综上所述,本研究证明了CS-6通过HSP90/突变p53途径抑制TNBC细胞增殖,CS-6和17-AAG对TNBC增殖的抑制具有协同作用。下一步,我们将建立动物实验模型,通过裸鼠皮下成瘤实验,研究CS-6与17-AAG联合使用的效果,为CS-6抗肿瘤功效的后期开发利用提供坚实的理论基础。

参考文献(References):

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] PRAT A, PINEDA E, ADAMO B, *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer[J]. *Breast*, 2015, 24(Suppl. 2): S26-S35.

(下转第228页)