

抑制生长因子受体连接蛋白-2表达对乳癌细胞生长的影响

叶韵斌, 陈慧菁, 刘 楠, 李洁羽, 陈 强*

(福建医科大学福建省肿瘤医院肿瘤免疫学研究室, 福建福州 350014)

摘要: 目的 进一步验证生长因子受体连接蛋白-2 (Grb2) 的表达在乳癌发展中的作用。方法 应用脂质体转染技术将 Grb2 小干扰 RNA (siRNA) 转染至乳癌细胞 SKB r3 中, 台盼蓝计数法测定存活细胞数, TUNEL 技术和 Annexin V/PI 染色分析转染后细胞的凋亡, 免疫细胞化学技术分析转染后细胞 Grb2 的表达。Western 蛋白质印迹法测定 Grb2、细胞外信号调节激酶 (p42/44 ERK)、磷酸化 p42/44 ERK (P-p42/44 ERK)、原癌基因蛋白质 c-Akt (Akt)、磷酸化 Akt (P-Akt) 和 STAT 5 转录因子表达的改变。流式细胞术检测细胞活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 3 的表达。结果 台盼蓝计数法结果显示, 转染 Grb2 siRNA 可有效抑制 SKB r3 的生长。TUNEL 实验显示, Grb2 siRNA 转染 SKB r3 细胞后, 随着时间延长, 凋亡细胞明显增加。Annexin V/PI 测定结果亦提示, Grb2 的抑制可明显诱导 SKB r3 细胞凋亡。转染 48 h 后, SKB r3 的活化 caspase 3 表达水平由 0.99% 升至 17.43%。免疫组化染色表明, Grb2 siRNA 转染细胞后, SKB r3 细胞 Grb2 表达明显下降, 由转染 24 h 后的 +~ 下降至转染 72 h 后的 +~-。Western 蛋白质印迹分析证实, Grb2 的抑制可导致 SKB r3 细胞 P-p42/44 ERK, P-Akt 以及 STAT 5 表达明显下降。P-p42 ERK 与 p42 ERK 的相对吸光度值之比由未转染的 (60 ±17)% 下降至转染 24 h 后的 (38 ±13)%, 及转染 48 h 后的 (21 ±8)%; P-p44 ERK 与 p44 ERK 的相对吸光度值之比, 由未转染时 (104 ±16)% 分别下降至 (49 ±13)% 及 (30 ±10)%; P-Akt 与 Akt 的相对吸光度值之比由未转染的 (40 ±6)% 下降至 (32 ±10)% 和 (15 ±4)%。与未转染组相比, 转染 24 及

48 h 后 STAT 5 相对吸光度值分别下降为 (64 ±6)% 和 (52 ±14)%。**结论** 抑制 Grb2 的表达可抑制乳癌细胞生长并诱导细胞凋亡。

关键词: 受体, 生长因子; RNA 干扰; 乳腺肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: Q78, R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)01-0055-08

分子生物学的进步及癌症治疗研究的发展已经表明, 癌症是一种多基因疾病, 肿瘤的发生和发展与癌基因的异常表达有关, 许多癌基因即为细胞信号传导途径中的分子^[1]。抗肿瘤药物的开发已经从传统的细胞毒性药物转向寻找与肿瘤相关的特异性信号通路为靶点的分子靶向药物的研究上^[2]。生长因子受体连接蛋白-2 (growth factor receptor-bound protein-2, Grb2) 是存在于细胞内的一个衔接蛋白, 它通过其 SH2 功能区与位于细胞膜上的生长因子受体, 如内皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), Her2^[3] 等的磷酸化酪氨酸残基相连, 同时 Grb2 利用其 SH3 功能区, 与细胞内不同信号传导分子的富含脯氨酸的位点结合^[4], 介导多条信号通路的活化。由此可见 Grb2 在细胞内信号转导网络中的重要地位, 尤其在启动 Ras-Raf-MAPK 信号通路中起关键的作用。在乳癌细胞, 尤其是 Her2 高表达的乳癌细胞中存在 Grb2 mRNA 的过表达^[5], Grb2 的高表达在乳癌的发展中起重要作用。因此, 抑制 Grb2 的功能就有可能抑制由 Grb2 诱导的 Ras 的活化, 达到抑制肿瘤生长的目的^[6]。RNA 干扰技术是近年来产生的新兴生物技术^[7], 是将目的基因所对应的小分子双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞中, 导致相应的 mRNA 降解, 从而阻断细胞中特定基因的表达。为此, 本研究应用 RNA 干扰技术, 封闭 Her2 高表达的乳癌细胞株 SKB r3 的 Grb2 分子, 观察 Grb2 表达抑制对肿瘤细胞生长的影响。

收稿日期: 2007-02-13 接受日期: 2007-10-15

基金项目: 福建省医学创新课题资助项目 (2007-CXB-1)

作者简介: 叶韵斌 (1964-), 女, 福建省福州市人, 主任医师, 主要从事肿瘤免疫学及肿瘤信号传导的研究。

* 联系作者 Email: cqiang8@pub5.fz.fj.cn Tel: (0591) 83679591 Fax: (0591) 83638757

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI-1640培养基和新生小牛血清购自美国Gibco公司；Annexin-V FITC Apoptosis Detection kit，CycleTEST plus DNA Reagent kit, caspase 3-FITC抗体，购自美国BD Pharmingen公司；TUNEL试剂盒购自Roche公司；针对Grb2分子的RNA干扰试剂盒GenEclipse™ Vector-Based RNAi系统购自美国Chemicon公司；核酸转染试剂盒Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司；小鼠ABC染色系统试剂盒购自美国Santa Cruz公司；多聚赖氨酸和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)购自北京中杉金桥生物公司；Grb2、ERK(p42/44)、磷酸化ERK(P-p42/44)、原癌基因蛋白质c-akt(proto-oncogen proteins c-akt, Akt)、磷酸化Akt(P-Akt)和STAT5转录因子等抗体购自Cell Signaling公司；辣根过氧化物酶(HRP)羊抗鼠IgG二抗，HRP羊抗兔IgG二抗等购自Santa Cruz公司。

1.2 细胞株及培养条件

人乳癌细胞株SKB r3购自中国科学院细胞库，用含10%新生小牛血清的DMEM培养基，于37℃，5%CO₂培养箱培养。

1.3 Grb2小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)的转染

用Lipofectamine™ 2000脂质体转染法，6孔板中每孔接种5×10⁴ SKB r3细胞，当细胞融合率达60%时进行转染(此时细胞处于对数生长期，状态最佳)。实验分为2组，每组6孔，分别为转染组和对照组，用不含血清和抗生素的DMEM培养过夜后再进行转染。对照组和转染组每孔分别加入含有2.5 μg(5 μL)空载体或Grb2 siRNA的无血清DMEM培养液125 μL，再加入溶有10 μL Lipofectamine™的无血清DMEM培养液125 μL。37℃，5%CO₂培养箱培养12 h后，各孔加入含20%胎牛血清的培养液500 μL，继续培养72 h。

1.4 台盼蓝染色法检测肿瘤细胞活性

取上述转染的肿瘤细胞，分别于转染后24、48及72 h获取悬浮的SKB r3细胞及经0.25%胰酶消化的贴壁细胞(以下操作同此)，制成细胞悬液，混合后用台盼蓝染色，普通显微镜下计数活细胞数。

1.5 TUNEL检测SKBr3细胞的凋亡

按Roche公司的原位细胞凋亡检测试剂盒说

书操作，略作修改。收集细胞，PBS洗涤后制备细胞涂片，并用4%多聚甲醛固定，滴加新配的渗透液(含0.1% Triton X-100的0.1%柠檬酸钠)，冰上孵育5 min，含0.1% Triton X-100的PBS洗3遍后，加TUNEL反应液(含末端脱氧核苷酸转移酶，核苷酸混合物)，放置于避光的湿盒中，37℃孵育1 h。含0.1% Triton X-100的PBS洗涤。空气干燥。加碱性磷酸酶耦合的抗荧光素抗体，置湿盒中，37℃孵育30 min。PBS洗涤3次。加入底物溶液(NBT/BCIP)，25℃避光孵育10 min，PBS洗涤3次，去离子水洗涤1次。经脱水、封片处理后，光学显微镜下观察，被染成蓝色的细胞即为凋亡细胞。计数300个细胞中凋亡细胞的数目，计算阳性率(凋亡细胞数/300×100%)。

1.6 Annexin V/PI检测凋亡细胞和死亡细胞比例

根据试剂盒说明书，收集转染后的细胞，用含有钙离子的缓冲液洗涤，分别加FITC标记的Annexin V和碘化丙啶(PI)，室温避光孵育15 min后，于流式细胞仪上检测。

1.7 免疫组化法检测Grb2和ERK的表达

分别于转染后24、48及72 h收集细胞，用PBS洗涤2次，1000×g离心5 min，将细胞均匀地涂于多聚赖氨酸包被的玻片上，风干，冷丙酮固定30 min。细胞先用1.5%的封闭血清孵育1 h，加一抗(抗Grb2抗体)，室温孵育30 min，PBS洗3次，加生物素耦联的二抗，孵育30 min，PBS洗3次。加入ABC复合物，室温孵育30 min，PBS洗涤后，滴加DAB显色5 min，常规脱水透明封固。观察，并拍片。免疫组化结果判断标准如下：-：细胞无染色或染色弱，染色细胞的阳性率<20%；+：细胞染色弱，染色细胞的阳性率20%~40%；++：细胞染色强，染色细胞的阳性率40%~75%；+++：细胞染色强，染色细胞的阳性率>75%。

1.8 Western蛋白质印迹技术检测相关信号分子的表达

收集经Grb2 siRNA转染的细胞，200×g，离心10 min，弃上清，用预冷的PBS洗涤2次，移至EP管。加入细胞裂解液。裂解液含：HEPES 50, NaCl 150, EGTA 1, MgCl₂ 1, Na₃VO₄ 0.01, Na₄P₂O₇ 0.01, NaF 0.01, 苯甲基磺酰氟(phenazine methosulfate)0.001 (mmol·L⁻¹)，10%甘油，1% Triton X-100及蛋白酶抑制剂组合(内含4-(2-氯乙基)苯磺酰氟化物(AEBSF)、胃酶抑素A、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂(E-64)、抑氨肽酶素B、亮肽酶素、抑酞酶

等。冰上孵育 30 min, 每隔 3~5 min 混匀 1 次, 必要时可超声处理 (100 W, 每次 5 s, 停 10 s, 5 次)。12 000 ×g, 4 °C, 离心 10 min, 收集上清液 (裂解蛋白), -20 °C 保存。

将上述样品加于 10% SDS-PAGE 分离胶中, 电泳 2~3 h; 应用 Bio-Rad 半干电转仪系统将胶上的蛋白转至硝酸纤维素膜上, 取抗 Grb2 抗体, 或 ERK (p42/44) 抗体、磷酸化 ERK (P-p42/44) 抗体、Akt 抗体、P-Akt 抗体、STAT5 转录因子抗体和微管蛋白抗体, 分别用 TBS-T 缓冲液 1:1000 稀释, 加到膜上, 4 °C 孵育过夜。加入 1:10 000 稀释的 HRP 标记的二抗, 室温作用 1 h。用 ECL 化学发光系统检测蛋白的表达。

1.9 流式细胞术检测活化 caspase 3 的表达

按照试剂盒说明书, 将药物处理过的细胞, 经 PBS 洗涤后, 重悬于固定/穿孔缓冲液中, 冰上孵育 20 min。经洗涤缓冲液洗涤后, 加 FITC 标记的活化 caspase 3 抗体 (C92~605), 避光孵育 30 min, 于流式细胞仪上检测。

1.10 统计学处理

以 4 次重复实验的结果作统计学处理。样本均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 Grb2 siRNA 转染 SKBr3 细胞及其对肿瘤细胞生长的抑制作用

应用台盼蓝拒染法计数经 Grb2 siRNA 转染不同天数后 SKBr3 的活细胞数, 发现对照组的 SKBr3 细胞仍呈持续增长的趋势, 未转染与转染空载体后 24, 48 和 72 h 的细胞数分别为 25×10^4 , $(32 \pm 4) \times 10^4$, $(43 \pm 10) \times 10^4$ 和 $(52 \pm 7) \times 10^4$; 而转染了 Grb2 siRNA 的细胞, 其生长受到抑制, 未转染与转染后 24, 48 和 72 h 的细胞数分别为 25×10^4 , $(24 \pm 5) \times 10^4$, $(16 \pm 4) \times 10^4$ 及 $(8 \pm 3) \times 10^4$ 。与对照组相比, 48 及 72 h 细胞数有显著差异, 说明 Grb2 siRNA 的转染有效抑制 SKBr3 细胞的生长和增殖。

2.2 转染 Grb2 siRNA 对 SKBr3 细胞凋亡的影响

如图 1 及表 1 所示, 随着转染后时间的延长, 转染空载体的 SKBr3 细胞 DAB 显色阳性的细胞 (即凋亡细胞) 比例略有增加, 但未见显著性差异, 而转染 Grb2 siRNA 的 SKBr3 细胞阳性细胞比例呈现明显增加的趋势。与转染空载体的对照组相比, 转染后 48 和 72 h, Grb2 siRNA 转染的细胞凋亡比例明显增高, 有显著性差异。提示 Grb2 siRNA 转染 SKBr3 细胞后, 能诱导细胞的凋亡。

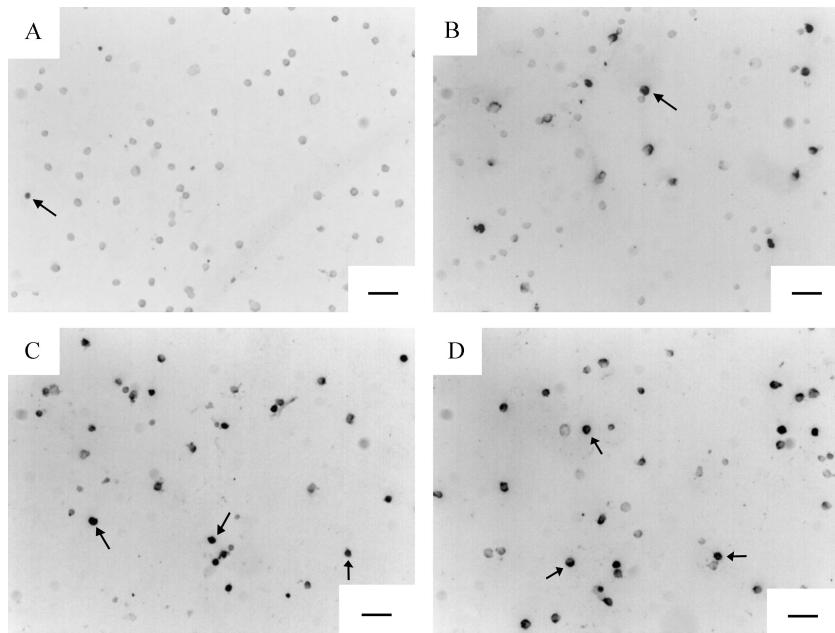


Fig 1 Effect of Grb2 small interference RNA (siRNA) transfection on apoptosis of SKBr3 ($\times 100$). A: SKBr3 cells without transfection; B, C and D: 24, 48 and 72 h after Grb2 siRNA transfection. The arrows showed the apoptotic cells detected by TUNEL test. Bar means 50 μ m.

Tab 1 Apoptosis of SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA

| Time after transfection/h | Percentage of apoptotic cells/% | |
|---------------------------|---------------------------------|-------------|
| | Control vector | Grb2 siRNA |
| 0 | 1.0 ±0.7 | 1.0 ±0.7 |
| 24 | 7.3 ±5.4 | 9.7 ±3.1 |
| 48 | 9.8 ±3.5 | 26.7 ±2.5** |
| 72 | 12.7 ±4.8 | 48.5 ±8.5** |

The apoptotic cells were determined by TUNEL assay. Data are expressed as mean ± SD. n = 4. ** P < 0.01, compared with the control vector group.

为了进一步证实 Grb2 siRNA 对 SKB r3 细胞毒性作用 ,应用 Annexin V /PI 联合检测方法 ,观察 Grb2 siRNA 转染细胞后不同时间细胞出现凋亡和坏死的比例。结果如图 2 所示 ,用二维散点图区分凋亡细胞和坏死细胞。其中 ,Annexin V + /PI - 的细胞为凋亡细胞 ,Annexin V + /PI + 细胞为坏死及晚期凋亡的细胞。可以看到 ,Grb2 siRNA 转染 SKB r3 细胞后 ,坏死细胞及晚期凋亡细胞比例明显增加。空

载体转染的细胞 ,没有出现明显的凋亡比例和坏死比例的增加 (图 3)。

进一步利用流式细胞术检测经 Grb2 siRNA 转染 48 h 的 SKB r3 细胞 caspase 3 的活化 ,从图 4 可以看到 ,转染了 Grb2 siRNA 的 SKB r3 细胞 ,其活化的 caspase 3 水平显著性增加 ,提示 Grb2 的抑制可能通过 caspase 3 途径促进 SKB r3 细胞的凋亡 [(0.99 ± 0.56)% vs (17.43 ± 12.95)%]。

2.3 Grb2 siRNA 转染对 SKBr3 细胞中 Grb2 表达的影响

2.3.1 免疫细胞化学法检测结果

收集 Grb2 siRNA 转染后 24, 48 和 72 h 的 SKB r3 细胞 ,制成细胞涂片 ,应用免疫细胞化学法检测 Grb2 的表达。如图 5 显示 ,转染空载体 24 h 后 ,SKB r3 细胞的 Grb2 表达水平为 ++ ,转染后 72 h 仍维持 ++ ~ ++ 的表达水平 ;而转染 Grb2 siRNA 的 SKB r3 细胞其 Grb2 的表达程度由 + ~ ++ (转染 24 h) ,降为 - ~ + (转染 72 h)。

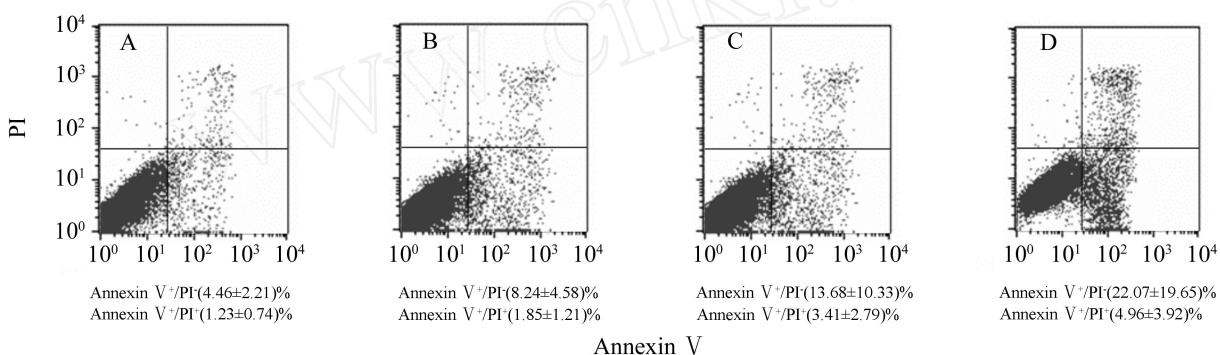


Fig 2 Effect of Grb2 siRNA transfection on SKBr3 cell apoptosis by Annexin V / PI staining A: SKBr3 cells without transfection; B, C and D: SKBr3 cells at 24, 48 and 72 h after transfection with Grb2 siRNA, respectively

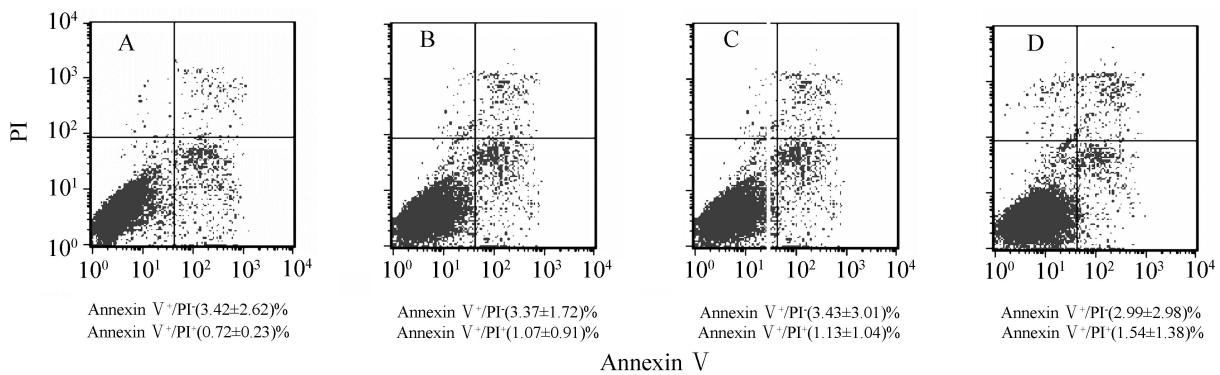


Fig 3 Effect of control vector on SKBr3 cell apoptosis by Annexin V / PI staining A: SKBr3 cells without transfection; B, C and D: SKBr3 cells at 24, 48 and 72 h after transfection with control vector, respectively

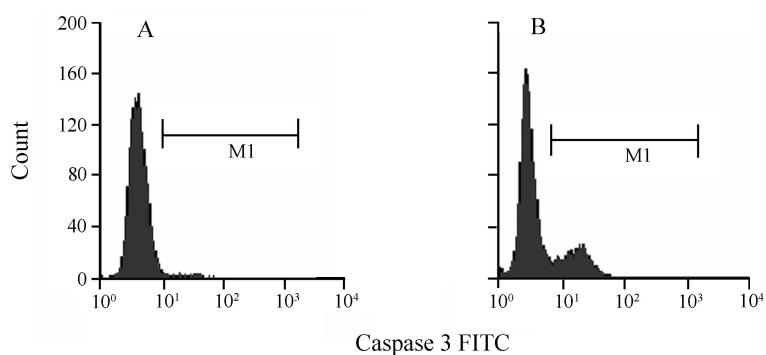


Fig 4 Expression of active caspase 3 in SKBr3 cells A: SKBr3 cells without transfection; B: SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA for 48 h

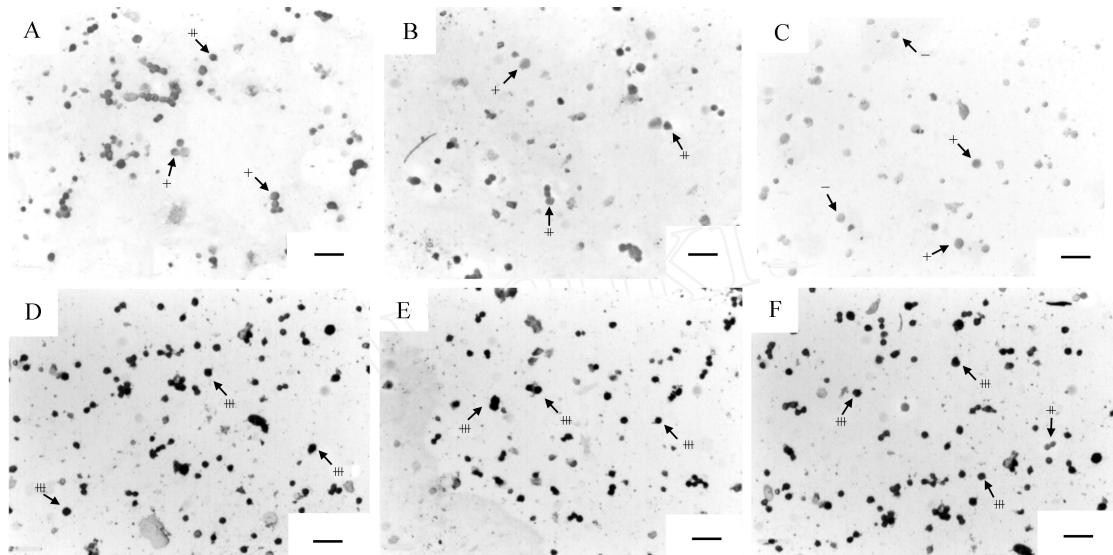


Fig 5 Immunocytochemistry result of Grb2 expression of SKBr3 cells transfected with siRNA (×100). A, B and C: SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA for 24, 48 and 72 h, respectively. The expression degree of Grb2 was + - +, + - + and - - +, respectively. D, E, and F: SKBr3 cells transfected with control vector for 24, 48, and 72 h, respectively. The expression degree of Grb2 was #, ##, and # - ##, respectively; bar means 50 μm. - : The cell was not stained, and the rate of stained cells in the field was <20%; +: the cell was slight stained, and the rate of stained cells in the field was 20% - 40%; +#: the cell was strong stained, and the rate of stained cells in the field was 40% - 75%; #: the cell was very strong stained, and the rate of stained cells in the field was >75%.

2.3.2 Western蛋白质印迹法检测结果

同时,收集未转染以及转染后 24和 48 h的细胞,Western蛋白质印迹法检测 Grb2的表达,可见,转染 24 h后,SKBr3细胞的 Grb2表达被轻度抑制,48 h后细胞内 Grb2的表达明显降低(图 6),进一步证实 Grb2 siRNA抑制了细胞内 Grb2表达。

2.4 Grb2 siRNA对肿瘤细胞信号传导分子表达的影响

应用 Western蛋白质印迹技术检测 SKBr3细胞信号转导分子的表达,结果显示,Grb2 siRNA转染

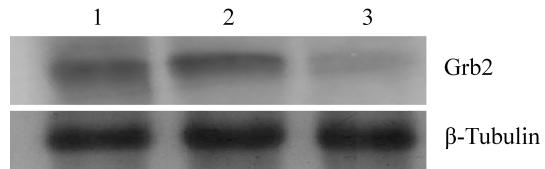


Fig 6 Grb2 expression of SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA. SKBr3 cells were transfected with Grb2 siRNA, and the Grb2 expression level was studied by Western blot assay. Lane 1: without transfection; lane 2: 24 h after transfection; lane 3: 48 h after transfection. The Grb2 expression was inhibited at 48 h after transfection.

SKB r3细胞后,细胞的 ERK(p42/44)和 Akt分子表达水平下降(图7)。同时,转染了 Grb2 siRNA后,SKB r3细胞内磷酸化的ERK,包括 P-p44和 P-p42,以及 P-Akt表达水平显著下降,而且 STAT 5转录因子的表达也明显下降。

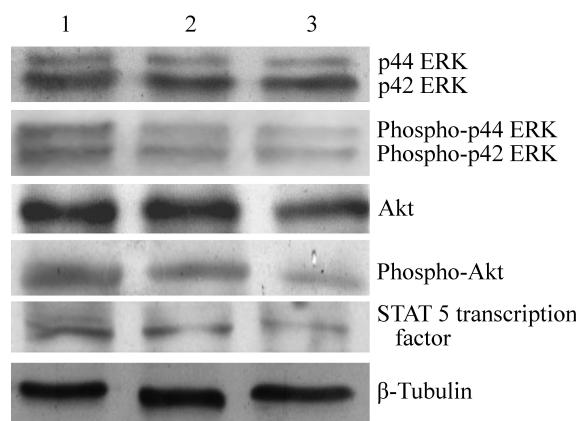


Fig 7. Western blot results of signal protein expressions of SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA. SKB r3 cells were transfected with Grb2 siRNA, and the expression level of signal proteins was studied by Western blot assay. Lane 1: without transfection; lanes 2 and 3: 24 and 48h after Grb2 siRNA transfection. Akt proto-oncogen proteins c-akt

转染了 Grb2 siRNA 的 SKB r3 细胞, P-p42 ERK 与 p42 ERK 的相对吸光度值之比,由未转染时的 (60 ±17)% ,明显下降至转染 24 h 后的 (38 ±13)% ,及转染 48 h 后的 (21 ±8)% ; P-p44 ERK 与 p44 ERK 的相对吸光度值之比,由未转染时的 (104 ±16)% ,显著下降至转染 24 h 后的 (49 ±13)% ,及转染 48 h 后的 (30 ±10)% ; P-Akt 与 Akt 的相对吸光度值之比,由未转染时的 (40 ±6)% ,明显下降至转染 24 h 后的 (32 ±10)% ,及转染 48 h 后的 (15 ±4)% 。与未转染时的相对吸光度值比较, STAT 5 转录因子的相对吸光度值亦在转染 Grb2 siRNA 后 24 和 48 h 有显著下降,分别为 (64 ±6)% 和 (52 ±14)% 。提示 Grb2 分子的阻断导致 SKB r3 细胞内相关信号通路的抑制。

3 讨论

作为细胞内一个重要的衔接蛋白,Grb2蛋白不具有任何的催化活性,它只通过 SH2和 SH3结构域

与其他分子相互作用^[8],且 Grb2主要在 MAPK信号传导中起作用^[9]。在本实验中,应用 RNA干扰技术封闭 Grb2分子的表达,结果导致了 Her2高表达的乳癌细胞 SKB r3 的生长抑制,与对照组相比,转染 Grb2 siRNA 后 72 h,活细胞数下降了 80%。免疫组化技术和 Western 蛋白质印迹法结果提示,这种生长抑制主要通过抑制 ERK的磷酸化水平,尤其是 p44 ERK的磷酸化,从而抑制了 MAPK信号通路,这与 SeboltLeopold 等^[10]的结果一致,即 MAPK信号通路的活化在 HER2诱导的乳癌细胞转化中起重要作用。Cussac 等^[11]应用计算机模拟技术,根据 Grb2与 Sos的结合序列,设计合成了可与 Grb2分子结合的二聚肽(peptidimer) c,阻断 Grb2-Sos复合体的形成,从而抑制 MAPK信号通路的激活。Gril 等^[12]在对 HER2高表达的乳癌细胞作用的研究中,观察到二聚肽 c明显降低 ERK1/2的活化,但对 Akt的活化不起作用。本实验结果却显示, siRNA介导的 Grb2的抑制还可导致 Akt磷酸化水平的降低以及 STAT 5分子表达的抑制。Lin 等^[13]应用反义核酸技术,也发现在 HER2高表达的细胞中, Grb2的阻滞导致了 Akt磷酸化的抑制,却不影响 ERK的表达以及活化。这可能与 Grb2分子抑制的方式不同有关,即在 RNA水平与在蛋白质水平阻断 Grb2分子,其对细胞内不同信号通路的影响是不同的。事实上,细胞内各种信号通路组成了细胞复杂的网络系统,它们相互作用,共同完成不同的细胞信号传递,并执行不同的细胞功能。在乳癌细胞中 MAPK信号通路对肿瘤细胞的生长以及肿瘤的形成起重要作用^[14],乳癌组织中 ERK mRNA 表达及 ERK蛋白和激酶活性都高于周围正常组织。近来研究表明, STAT 5转录因子也与许多肿瘤的发生、发展以及预后密切相关^[15~16]。陈晶等^[17]发现,在正常乳腺组织中, STAT 5转录因子表达为阴性,而在 72 例乳癌组织中其阳性表达率高达 65.3%,且随着肿瘤恶性程度的增高,其阳性表达率和表达水平逐渐增加,证实 STAT 5转录因子在乳癌的发生、发展及侵袭、转移中的作用。但 Grb2与 STAT 5转录因子的直接关联却未见报道,究竟 Grb2的抑制如何影响 STAT 5转录因子的表达有待进一步的研究。

本研究结果提示, Grb2分子的封闭可阻断细胞内相关信号通路的传递,并活化胞内 caspases 3 分子,从而诱导 SKB r3 细胞凋亡,抑制细胞的生长、增殖,有望成为新的抗肿瘤作用的靶点。

4 参考文献:

- [1] Zhang Z, Li M, Rayburn ER, Hill DL, Zhang R, Wang H. Oncogenes as novel targets for cancer therapy (part 2): growth factors and protein tyrosine kinases[J]. *Am J Pharmacogenomics*, 2005, **5**(3): 173 - 190.
- [2] Broxterman HJ, Georgopapadakou NH. New cancer therapeutics: target-specific in, cytotoxics out [J]? *Drug Resist Update*, 2004, **7**(2): 79 - 87.
- [3] Janes PW, Daly RJ, deFazio A, Sutherland RL. Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2 [J]. *Oncogene*, 1994, **9**(12): 3601 - 3608.
- [4] Simon JA, Schreiber SL. Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions[J]. *Chem Biol*, 1995, **2**(1): 53 - 60.
- [5] Daly RJ, Binder MD, Sutherland RL. Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 1994, **9**(9): 2723 - 2727.
- [6] Tari AM, Lopez-Berestein G. GRB2: a pivotal protein in signal transduction [J]. *Semin Oncol*, 2001, **28**(5 Suppl 16): 142 - 147.
- [7] Hannon GI. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, **418**(6894): 244 - 251.
- [8] Feller SM, Tuchscherer G, Voss J. High affinity molecules disrupting GRB2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukaemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, **44**(3): 411 - 427.
- [9] Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling[J]. *Cell*, 1992, **70**(3): 431 - 442.
- [10] Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(56): 6594 - 6599.
- [11] Cussac D, Vidal M, Leprince C, Liu WQ, Comille F, Tiraboschi G, et al. A Sos-derived peptidomimetic blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity [J]. *FASEB J*, 1999, **13**(1): 31 - 38.
- [12] Gril B, Vidal M, Assayag F, Poupon MF, Liu WQ, Garbay C. Grb2-SH3 ligand inhibits the growth of HER2⁺ cancer cells and has antitumor effects in human cancer xenografts alone and in combination with docetaxel [J]. *Int J Cancer*, 2007, **121**(2): 407 - 415.
- [13] Lim SJ, Lopez-Berestein G, Hung MC, Lupu R, Tari AM. Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(54): 6271 - 6276.
- [14] Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T, Morishita Y. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer [J]. *Oncology*, 1999, **57**(Suppl 2): 37 - 44.
- [15] Kelly JA, Spolski R, Kovanen PE, Suzuki T, Bollenbacher J, Pise-Masison CA, et al. Stat5 synergizes with T cell receptor/antigen stimulation in the development of lymphoblastic lymphoma [J]. *J Exp Med*, 2003, **198**(1): 79 - 89.
- [16] Xi S, Zhang Q, Gooding WE, Smithgall TE, Grandis JR. Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2003, **63**(20): 6763 - 6771.
- [17] Chen J, Shan BE, He ZG, Dong ZM, Dong JZ, Ma H. Expression of STAT5 and β -catenin in human breast carcinoma and its clinical significance [J]. *China Oncol (中国癌症杂志)*, 2006, **16**(2): 89 - 92.

Effect of inhibiting expression of growth factor receptor-bound protein-2 on proliferation of breast cancer cells

YE Yun-Bin, CHEN Hui-Jing, LIU Fang, LI Jie-Yu, CHEN Qiang*

(Laboratory of Immuno-oncology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350014, China)

Abstract: AIM To confirm the effect of growth factor receptor-bound protein-2 (Grb2) inhibition on the advance of breast cancer.

METHODS Grb2 small interference RNA (siRNA) was transfected to breast cancer cells (SKBr3) by Lipofectamine transfection system. Trypan blue exclusion assay was used to observe the inhibition of cell proliferation. The apoptosis of breast cancer cells induced by

Grb2 siRNA was analyzed using TUNEL assay and Annexin V/PI staining. The expression of Grb2 in SKBr3 cells transfected with Grb2 siRNA was examined with immunocytochemistry. The expression of signal molecules including Grb2, extracellular signal-regulated kinase (p42/44 ERK), phosphorylated ERK (P-p42/44 ERK), proto-oncogene proteins c-akt (Akt), phosphorylated Akt (P-Akt) and STAT

5 transcription factor was evaluated by Western blot assay. Caspase-3 was examined by flow cytometry (FCM). **RESULTS** Trypan blue exclusion assay showed that Grb2 siRNA could inhibit the growth of SKB r3 cells significantly. TUNEL test demonstrated that the percentage of apoptotic cells increased greatly on SKB r3 cells transfected with Grb2 siRNA in a time-dependent manner. Annexin V /PI analysis also suggested that the inhibition of Grb2 lead to the apoptosis of SKB r3 cells obviously. After transfection for 48 h, the level of active caspase 3 of SKB r3 cells was up to 17.43% from 0.99%. Immunocytochemistry demonstrated that the expression of Grb2 decreased greatly in SKB r3 cells transfected with Grb2 siRNA, and the expression degree decreased from ++ (24 h after transfection) to + to - (72 h after transfection). Western Blot assay showed that the inhibition of Grb2 could decrease the level of phosphorylated ERK (including P-p42 and P-p44), P-Akt and STAT 5 transcription factor of SKB r3 cells significantly. The ratio of relative band density of P-p42 ERK vs p42 ERK was respec-

tively (60 ± 17) % for without transfection, (38 ± 13) % at 24 h after transfection, and (21 ± 8) % at 48 h after transfection; the ratio of P-p44 ERK vs p44 ERK was respectively (104 ± 16) % for without transfection, (49 ± 13) % at 24 h after transfection, and (30 ± 10) % at 48 h after transfection; the ratio of P-Akt vs Akt was respectively (40 ± 6) % for without transfection, (32 ± 10) % at 24 h after transfection, and (15 ± 4) % at 48 h after transfection; the relative band density of STAT 5 transcription factor decreased to (64 ± 6) % at 24 h after transfection and (52 ± 14) % at 48 h after transfection, compared to that without transfection. **CONCLUSION** Inhibition of Grb2 expression has inhibitory effect on breast cancer cells and induces apoptosis.

Key words: receptors, growth factor, RNA interference; breast neoplasms; apoptosis

Foundation item: The project supported by Fujian Medical Innovation Project (2007-CXB-1)

* Corresponding author

(本文编辑 乔虹)

欢迎订阅 2008年《医药导报》杂志

《医药导报》杂志系中国药理学会等联合主办的医药专业期刊,是国家科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),被美国《化学文摘》(CA)、《国际药学文摘》(IPA)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)收录。2006年被评为湖北省优秀期刊。是万方数据库、中文科技期刊数据库、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,经国家新闻出版总署批准面向国内外公开发行。

该刊设有“特约稿”“药物研究”“药物与临床”“药学进展”“用药指南”“药品质量控制”“新药介绍”“药物制剂”“药物不良反应”“药事管理”“作者·编者·读者”等栏目,每期组编某类药物或某类疾病的药物治疗专栏。读者对象是临床医师、药师、医药院校师生和医药研究所、药品检验所的科技工作者及药品监督管理、医药工商企业经营者。

《医药导报》为月刊,每月1日出版,每期10.00元,全年120.00元(含邮资),欢迎广大读者到当地邮局订阅,如错过邮局订阅时间,可随时向该刊编辑部邮订。地址:武汉市解放大道1095号同济医院内,邮政编码:430030,网址:www.yydbzz.com或www.yydb.cn;Email:y198203@public.wh.hb.cn。电话及传真:(027)83643083,83666619。国内邮发代号38-173。国外邮发代号:BM648。国内统一刊号:CN42-1293/R,国际标准出版物号:ISSN1004-0781。广告许可证:武工商0620号。