

HRD1 对乳腺癌细胞增殖和迁移能力的影响及潜在机制研究

窦 燕

北流市人民医院病理科 广西北流 537400

[摘要]目的 针对羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1 (HMC - CoA reductase degradation protein 1, HRD1) 对乳腺癌细胞增殖和迁移能力的能力展开较为详细的分析和论述, 并探讨其潜在机制。方法 利用免疫组织化学实验和 Western blot 对 HRD1 和乳酸脱氢酶 B 在乳腺癌组织和相应癌旁组织中的表达进行检测。用腺病毒感染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7 过表达 HRD1, 观察 HRD1 和乳酸脱氢酶 B 的表达水平, MTT 实验和平板克隆试验检测细胞的增值能力, Transwell 实验检测细胞的迁移能力。结果 与癌组织进行对比, HRD1 在配对的癌旁组织中高表达, 乳酸脱氢酶 B 则呈现出低表达 ($P < 0.05$); 过表达 HRD1 能够显著降低腺病毒感染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增值与迁移能力, 此差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 过表达 HRD1 对于乳腺癌细胞的增值和迁移能力有较为明显的抑制作用, 其潜在机制为通过乳酸脱氢酶 B 蛋白的下调来表达实现。

[关键词] 乳腺癌; 细胞增殖; 迁移; 潜在机制

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1677-3219 (2021) 01-001-03

目前癌症是我国致死率排名第一的疾病^[1]。根据中国癌症最新数据报告显示, 女性乳腺癌发病率排名第一, 死亡率居第五, 由此可见作为一种恶性肿瘤, 乳腺癌已经严重威胁到女性的生命健康^[2]。并且在近年来的发展中, 乳腺癌的发病年龄逐渐呈现年轻化的趋势, 基于此要针对乳腺癌的发病机制展开详细的研究。

根据相关的报道得知在乳腺癌调控以及神经退化性疾病等等增生过程中都有 HRD1 的参与, 此外也有报道表明在乳腺癌的发生发展中有乳酸脱氢酶 B 的参与, 但是针对 HRD1 参与到乳腺癌发生发展中的二级制还尚未明显。基于此本次研究针对乳酸脱氢酶 B 在 HRD1 抑制乳腺癌细胞增值和迁移中所起到的作用展开详细的分析。众所周知多数疾病的发生发展和蛋白质的错误折叠与内质网功能紊乱都存在一定的关系, 而 HRD1 是被定位于内质网中的跨膜环形泛素连接酶, 最早被发现于哺乳动物和酿酒酵母中, 对于内质网中错误折叠的蛋白质能够起到降低的作用, 因此文章围绕 HRD1 对乳腺癌细胞的增值和迁移影响展开全面的分析和探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

从我院抽取 6 例乳腺癌患者的组织样本和 6 例癌旁正常乳腺组织样本, 为了确保实验的准确性, 所抽取的病例并没有接受过放疗和化疗治疗。为了了解样本的实际情况, 现利用 TNM 检测法对组织样本进行检测, 根据结果乳腺癌患者的组织样本中其中 4 例样本为 II - III 期, 2 例样本为 I - II 期, 而在对照组样本中, 其中 4 例样本为浸润性导管癌, 2 例样本为导管内癌。此外从我国实验室中抽取乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

第一步是进行细胞培养, 将 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞系置于培养箱内。

1.2.2 蛋白质免疫印迹

蛋白质免疫印迹分为几个步骤: 一裂解细胞; 二提取细胞蛋白; 三实施总蛋白电泳; 四蛋白质转到 PVDF 膜上; 五室温封闭; 六一抗过夜; 七二抗室温孵育两小时。

1.2.3 细胞转染

细胞转染是第三个环节, 选取生长状态较好的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, 将其接种在 6 孔板上, 在 24 小时候进

行转染。

1.2.4 MTT 比色法检验细胞增值能力

在细胞转染之后是利用 MTT 比色法检验细胞增值能力。一制作培养液悬液细胞; 二进行细胞接种; 三培养 4 天之后加入 200 μ l MTT 溶液孵育; 四孵育取出每孔加入 150 μ l 的 DMSO 溶解; 五选择波长分析测定各孔光吸收值。

1.2.5 集落形成实验

将对数生长期细胞制成细胞悬液, 根据乳腺癌细胞的繁殖能力, 以每皿 100 个细胞密度接种到 6 孔板中, 在恒温培养箱内进行培养, 两周之后进行拍照分析。

1.2.6 Transwell 实验检测各组细胞的迁移活性

在 Transwell 实验中将上述中细胞采用无血清培养基重悬, 之后加入 2×10^4 个细胞, 随之加入培养基, 在细胞培养箱内培养 12 小时, 随机抽取 5 个视野进行拍照计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。以上所有实验重复 3 次, 计量结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HRD1 在乳腺癌组织中低表达, 乳酸脱氢酶 B 在乳腺癌组织中高表达

通过对组织样本进行检测, 根据数据结果显示相对于癌旁组织, HRD1 蛋白水平在癌组织中的表达较大, 且差异具有统计学意义 ($P \leq 0.05$, $n=6$), 如图所示。

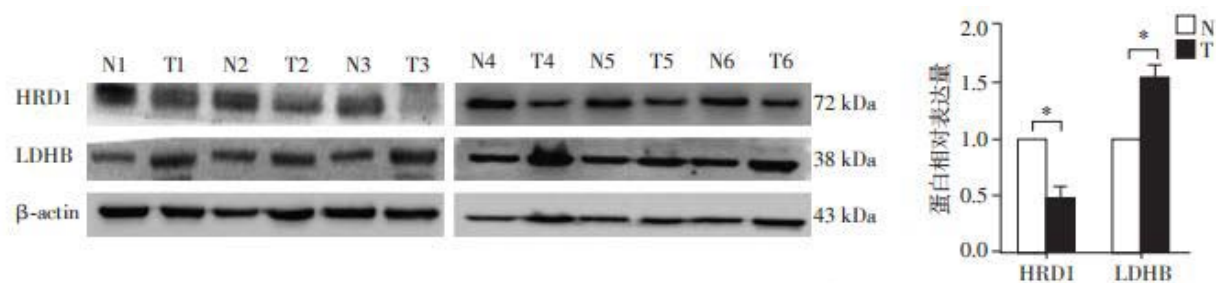
2.2 HRD1 过表达抑制乳腺癌细胞的增值和迁移

从图二中的 A 图、B 图可以看出与对照组相比, HRD1 对于乳腺癌细胞的生长有明显的抑制作用。

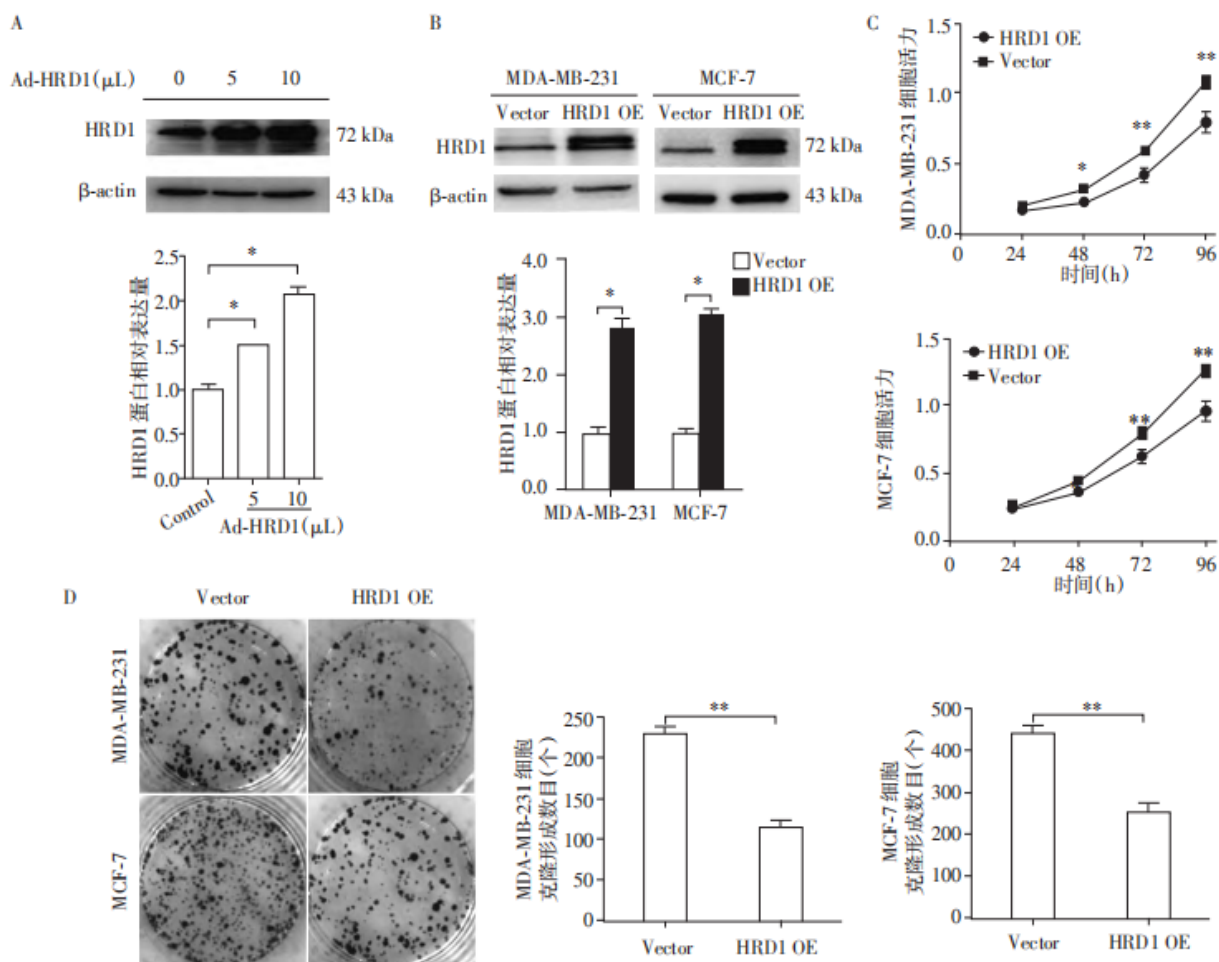
根据集落形成实验得到的数据和现象表明相对于对照组来说, 外源性过表达 HRD1 在乳腺癌细胞生长的过程中具有较为明显的抑制作用, 且差异具有统计学意义。同时针对过表达 HRD1 腺病毒在细胞迁移中所起到的作用进行了观察得出相关的结论, HRD1 过表达所迁出小室的细胞数量明显减少。

2.3 在乳腺癌细胞系中, 外源性过表达 HRD1 可降低乳酸脱氢酶 B 的蛋白表达

如图三所示, 通过相关的实验我们得出结论, HRD1 不仅在乳酸脱氢酶 B 下调表达中起到非常关键的作用, 并且还能够有效的抑制乳腺癌细胞的增值和迁移。

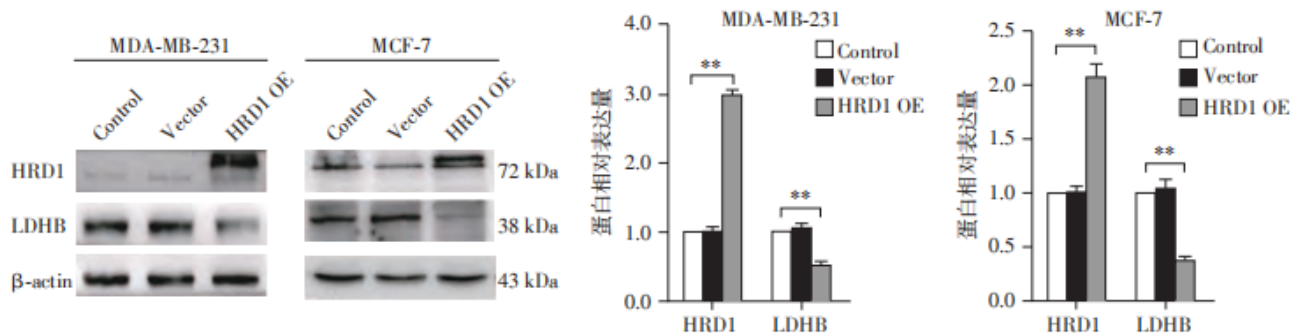


图一



A、B: 在乳腺癌细胞系中感染 HRD1 过表达腺病毒 24 h 后检测 HRD1 蛋白表达水平, $P < 0.05$ ($n=3$); C: MTT 实验检测细胞增殖能力, $P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($n=3$); D: 集落形成实验检测细胞增殖能力, $^{**}P < 0.01$ ($n=3$)。

图二



在乳腺癌细胞系 MDA-MB231 和 MCF-7 中感染 HRD1 过表达腺病毒 24 h 后检测 HRD1 及 LDHB 蛋白表达水平; $^{**}P < 0.01$ ($n=3$)。

图三

3 讨论

(下转第 4 页)

0.01)^[5]。动物实验的研究成果进一步表明,脑脊液及血清中S-100B及NSE均能反应脑损伤程度,作为缺血性脑卒中的生物学指标,可进一步为临床患者提供血液及脑脊液标本采集的时间窗口;SD大鼠血清及脑脊液中S-100B及NSE在不同时间段呈趋势性变化;脑脊液中S-100B、NSE水平增高时间均早于血清中S-100B、NSE水平增高时间;脑损伤后12h,脑脊液中NSE水平即可达到峰值,血清中S-100B、NSE水平增加,3d后达到峰值;血清和脑脊液中S-100B、NSE水平与梗死面积、神经功能评分均呈正相关($P < 0.05$)^[6]。S100B和NSE联合检查对颅脑损伤患者早期预后判断有着较高的应用价值,有助于早期制定预防措施,保证预后效果;尤以轻度、中度、重度3组S100B和NSE水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$);重度组患者S100B及NSE水平明显高于轻度组和中度组患者,3组血清蛋白水平和神经酶阳性率明显升高,其中重度组患者血清NSE阳性率最高,依次是中度组和轻度组,差异有统计学意义($P < 0.05$)^[7]。S100B蛋白和神经元特异性烯醇化酶是神经特异性、灵敏度较高的生化标志物,其测定方便,可作为评估颅脑损伤严重程度和预后的参考指标。严重颅脑创伤及其后遗症可导致不同程度的神经系统功能障碍,特别是颅脑损伤后学习记忆功能障碍会对患者的生活质量产生严重影响^[8]。从诊断机理来讲,三个脑损伤生物学标志物在围产儿脑损伤中的作用和影响,对早期诊断、病情严重程度评估及治疗后的远期预后具有指导意义。该实验室检查相对头颅B超、头部影像学检查来说,价格更为便宜,而且抽取标本方便,实验方法简单,可以动态监测其水平,在病情不允许外出检查的情况下,也能开展,能早于影像学检查诊断脑损伤患儿病情,并对预后做出一定评估,指导患儿家属后期积极治疗,减少脑瘫患儿发生,降低残疾率,减轻神经系统后遗症的发生,减轻患儿家属经济负担,对提高新生儿生存质量,提高人群素质,推进围生医学的发展具有深远的意义。

综上所述,颅脑损伤中的血清S100B、NSE、脑红蛋白在新生儿科患者中的高水平表达,提示患者的病症加重,三项指标的检测具有极高的诊断结果一致率、敏感度、特异性、

阳性预测值,指的在该类患者的临床诊疗实践中大力推广实施。

[参考文献]

- [1] 赵宏,金瑄.S100B蛋白和血清NSE在新生儿胆红素脑损伤早期诊断中的意义[J].湖南师范大学学报(医学版),2014,11(3):67-69.
- [2] 韩亚梅,张娟丽.人促红细胞生成素对新生儿缺氧缺血性脑病血清NSE和S-100B蛋白影响的系统评价[J].兰州大学学报(医学版),2017,43(4):56-64.
- [3] 王智华,林庆喜,黄平香,等.血清CNP、IGF-Ⅱ、ET、NSE和S100B在颅脑外伤中的临床应用研究[J].国际检验医学杂志,2017,38(21):2984-2987.
- [4] 阴崇娟,阴怀清.新生儿血清不同水平胆红素对NSE及S100B蛋白的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2015,(12):1433-1434.
- [5] 马菲,张蕾.血清中NSE及S100B蛋白检查对预测高胆红素血症早产儿胆红素脑损伤的临床意义[J].中国当代医药,2014,21(6):4-7.
- [6] 牛莉莉,闫文萍,马红萍,等.血清、脑脊液中S-100B、NSE水平与缺血性脑卒中的研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(3):285-289.
- [7] 余美红.S100B和NSE联合检查对颅脑损伤患者早期预后判断的应用价值[J].浙江创伤外科,2019,24(3):571-572.
- [8] 安翠红(综述),张小平,程爱国(审核).颅脑损伤后血清S100B、NSE检查的意义[J].医学综述,2015,(19):3489-3492.

表2:两组血清S100B、NSE、脑红蛋白结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清S100B ($\mu\text{g/L}$)	NSE ($\mu\text{g/L}$)	脑红蛋白 (g/L)
实验组	30	0.5 ± 0.2	17.8 ± 1.9	0.7 ± 0.2
对照组	30	0.2 ± 0.1	10.2 ± 0.7	0.3 ± 0.1
t	/	8.632	9.641	13.695
P	/	0.023	0.012	0.000

(上接第2页)

作为一种全球较为常见的恶性肿瘤,乳腺癌对女性的身心健康造成了非常严重的影响。根据相关的研究和报道得知乳腺癌发病机制受到多种因素的影响,而蛋白质的降解异常就是其中之一。HRD1是一种跨膜的环形泛素连接酶,在内质网蛋白质降解的过程中扮演着非常重要的角色,有相关的实验表明HRD1能够对腺病毒组织细胞中某种癌基因表达产生进行降解,从而对乳腺癌的发展起到了一定的抑制作用。在本次的研究中选用了我院收治的6例乳腺癌患者的癌组织细胞作为样本,通过相关检测发现HRD1在其中呈现低表达,而乳酸脱氢酶B呈现高表达,进一步证实了乳腺癌细胞系中外源性过表达HRD1能够有效的降低乳酸脱氢酶B的蛋白表达。与此同时HRD1过表达对于乳腺癌细胞的增殖和迁移能力具有明显的抑制作用,其主要原理是HRD1通过下调乳酸脱氢酶B的表达从而对进而影响到肿瘤细胞中的糖代谢,实现了乳腺癌细胞增殖和迁移的抑制。

综合以上得出相关的结论:HRD1是一种能够抑制乳腺癌发展的新机制,通过下调乳酸脱氢酶B的表达从而产生乳腺

癌细胞的糖代谢异常,进而对癌细胞的增殖和迁移能力起到一定的抑制作用。

[参考文献]

- [1] 张亚柯,隋英丽,王梅月,成翠芹,李光勇,王瑞,李军.SCP1对人乳腺癌细胞迁移和增殖的影响及其机制[J].聊城大学学报(自然科学版),2019:31-36.
- [2] 蒋子威,刘胜.乳移平对乳腺癌细胞增殖和迁移能力影响及机制研究[J].上海中医药杂志,2019:97-101.
- [3] 洪晔,蔡宏伟,苏东明.HRD1对人乳腺癌细胞增殖迁移的影响及其机制初步研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018:42-46+58.
- [4] 徐炎炎,卓倩,汤洋洋,王庆苓.EPCR对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移的影响及机制[J].山东医药,2018:13-16.
- [5] 吕峰,李翠,孔舒欣,梁栋,于洋,张斌.p55PIK蛋白对ER(-/+)乳腺癌细胞增殖和迁移能力的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2018:50-54.