

## Caveolin-1 促进乳癌 Hs578T 耐药细胞株侵袭和转移\*

郑亚民<sup>1)</sup> 李非<sup>1)</sup> 齐保聚<sup>1)</sup> 吴平<sup>2)</sup> 孙海晨<sup>1)</sup> 刘爽<sup>1)</sup> 陈建文<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>首都医科大学宣武医院普外科, 北京 100053;

<sup>2)</sup>中国科学院生物物理研究所系统生物学研究中心, 北京 100101)

**摘要** 通过基因转染技术培育 caveolin-1 过表达乳癌 HS578T 耐药细胞株 Hs578T/Dox+cav-1 和空载体细胞株 Hs578T/Dox+vector, 探讨 caveolin-1 蛋白对耐药肿瘤细胞体内和体外侵袭转移能力的影响. 由于 caveolin-1 表达的增加, Hs578T/Dox+cav-1 细胞形态变为长梭形, 伪足更长而伸展, 其粘附能力高于空载体 Hs578T/Dox+vector 细胞株( $(0.897 \pm 0.163)$  vs  $(0.633 \pm 0.053)$ ,  $P < 0.01$ ). 侵袭小室试验发现, Hs578T/Dox+cav-1 侵袭转移能力增强, 培养 6 h 迁徙进入微孔膜的细胞数比 Hs578T/Dox+vector 细胞株明显增多 ( $(107.8 \pm 10.9)$  vs  $(80.8 \pm 8.07)$ ,  $P < 0.01$ ), 侵袭破坏 matrigel 基质蛋白胶进入膜内的细胞数也明显增多 ( $(68.8 \pm 9.88)$  vs  $(25.6 \pm 5.41)$ ,  $P < 0.01$ ). 悬浮培养的 Hs578T/Dox+cav-1 细胞比 Hs578T/Dox+vector 细胞更容易聚集, 形成相对较致密的细胞团块, 24 h 检测流式细胞凋亡指数下降 ( $(8.79 \pm 1.54)\%$  vs  $(16.42 \pm 1.42)\%$ ,  $P < 0.01$ ). 这表明其具有更强的抗失巢凋亡和继续生存的能力, 为循环转移的肿瘤细胞定植前取了更多时间. Hs578T/Dox+vector 细胞在裸鼠皮下种植成瘤试验中不能成瘤, 而 Hs578T/Dox+cav-1 细胞接种 15 只裸鼠, 全部形成肿瘤, 平均直径  $(0.8 \pm 0.45)$  cm. 发现一只成瘤裸鼠双肺可见瘤样肿块转移. HE 病理组织染色见肿瘤细胞弥漫性分布, 细胞核异型性明显. 上述结果表明, caveolin-1 对 Hs578T 耐药肿瘤细胞侵袭、转移和成瘤性具有明显的促进作用.

**关键词** caveolin-1, 乳癌 Hs578T 细胞, 侵袭, 转移

**学科分类号** Q756, R730

Caveolae 结构是一种细胞质膜向内凹陷所形成的囊状结构, 是信号分子富集和信号传导的枢纽. Caveolin-1 (cav-1) 是其标志蛋白, 和肿瘤形成、生长和凋亡关系密切, 它是当前细胞生物学研究的热点之一. Caveolin-1 基因定位在染色体 7q31.1 位置, 此位置丢失或突变可诱发肿瘤形成, 传统上被认为是一种抑癌基因. 但是, 这一观念近年来受到挑战. Hurlstone 等<sup>[1]</sup>发现, 人类早期的肿瘤或肿瘤细胞系中的 CAV1 位点没有变化, 并且与抑癌基因如 Trp53, Apc 和 Rb 不同, 敲除 CAV1 的小鼠并不会自发发生肿瘤. 通过免疫组化和蛋白质印迹 (Western-blot) 方法的研究报道显示, 不同肿瘤组织和细胞系 caveolin-1 蛋白表达的增加和减少缺乏一致性变化<sup>[2]</sup>. 为了解释 caveolin-1 在肿瘤作用中的两面性, Liscovitch 等<sup>[3]</sup>提出“双重作用”理论. 肿瘤在发生发展和转移过程中是不断适应新环境变化的, 在肿瘤发生早期, caveolin-1 蛋白表达较低,

这是为了避免其发挥抑制肿瘤发生和发展的作用. 随着肿瘤进入快速生长、转移以及化疗耐药阶段, 为了适应环境变化, 发挥信号传导中枢作用的 Caveolae 结构和 caveolin-1 蛋白会明显增多, 以适应在新的环境中继续生存和耐受凋亡.

在我们研究 caveolin-1 对肿瘤细胞耐药性作用的基础上<sup>[4]</sup>, 我们继而选用乳癌 HS578T 阿霉素耐药株细胞 (Hs578T/Dox), 通过基因转染技术培育 caveolin-1 过表达细胞系和构建裸鼠种植瘤模型, 深入探讨 caveolin-1 对肿瘤细胞体内和体外侵袭转移能力的影响.

\*国家自然科学基金资助项目(30230120).

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-64888523, Fax: 010-64888513

E-mail: chenmaci@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2006-12-19, 接受日期: 2006-12-26

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株.** 乳癌 Hs578T 细胞株(Kjell Grankvist 博士赠送, Umea University, Sweden)经阿霉素(doxorubicin Dox)筛选培养获得耐药株 Hs578T/Dox. 过表达 caveolin-1 细胞株 Hs578T/Dox+cav-1 以及它的对照株 Hs578T/Dox+vector 取自中国科学院生物物理研究所<sup>[4,5]</sup>.

**1.1.2 实验动物.** 试验用 BALB/C 裸鼠购自中国医学科学院实验动物研究所. 4~6 周龄, 体重 10~12 g 裸鼠, 随机分组, 每组 15 只. 饲养于首都医科大学动物实验中心 SPF 饲养室.

**1.1.3 试剂.** RPMI 1640 细胞培养基、L- 谷氨酰胺、二甲基亚砜(DMSO)、MTT、胰蛋白酶购自北京天来生物工程公司; 胎牛血清购自 PAA Laboratories GmbH 公司; 多聚 -HEMA 基质胶(2-hydroxyethyl methacrylate)购自 Sigma 公司; Matrigel 基质蛋白胶购自 BD 公司. 侵袭小室 Millicell 购自 Millipore 公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和观察.** 使用含有 10%胎牛血清、2 mmol/L L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基, 在恒温 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件温箱中培养, 细胞单层贴壁生长. 观察细胞形态和生长特性.

**1.2.2 细胞粘附试验.** 在 4°C 下用 100 mg/L Matrigel 基质胶包被预冷的 96 孔板, 每孔 200  $\mu$ l (20  $\mu$ g), 室温无菌条件下晾干. 对数生长期细胞经消化离心, 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液制作细胞悬液 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml. 每孔加入 200  $\mu$ l (10<sup>4</sup> 个)细胞. 在 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 60 min 取出. PBS 冲洗 3 遍, 洗掉未贴壁细胞. 加入无血清 1640 培养液配置的 5 g/ml MTT 50  $\mu$ l. 继续培养 4 h 中止. DMSO 充分溶解结晶物. 550 nm 波长酶标仪测定吸光度值. 每组细胞设 8 个复孔.

**1.2.3 细胞迁徙和侵袭试验.** Albini<sup>[6]</sup>设计的侵袭小室试验是体外检测肿瘤细胞侵袭能力的经典方法, 在体外较理想地模拟了侵袭和转移的过程. 其结果综合反映了肿瘤细胞的运动迁徙能力和对细胞外基质的降解能力. 细胞迁徙试验, 无血清 RPMI1640 培养液进行细胞培养 36 h, 离心收集上清液, 加入纤维连接蛋白(fibronectin)浓度至 2.5 mg/L, 置入 millicell 侵袭小室的下室作为趋化因子液. 将直径为 13 mm 孔径为 8  $\mu$ m 的聚碳酸酯微孔膜置入侵

袭小室上下室之间. 细胞培养 48 h 对数生长期时, 消化离心. PBS 洗 3 次, 无血清 RPMI1640 制备细胞悬液 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml, 台盼蓝染色检测细胞活力 95%以上. 每个侵袭小室上室中加入细胞悬液 0.2 ml (1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞). 培养箱中培养 6 h, 取下微孔膜, 用 100%甲醇棉球擦尽上表面细胞后, 甲醇固定和苏木精染色. 显微镜下观察穿入膜内细胞, 计数中间及四周 5 个高倍 (400 倍) 镜下视野细胞数, 计算平均数. 每组细胞 5 个样本, 计算均数进行比较. 细胞侵袭试验, 提前在 4°C 融解 Matrigel 基质蛋白胶, 每个聚碳酸酯微孔膜表面铺以 100  $\mu$ l (70  $\mu$ g) Matrigel 胶, 放入培养箱中 4 h 凝固备用. 其余操作同迁徙试验.

**1.2.4 抗失巢凋亡检测.** 根据失巢凋亡试验<sup>[7,8]</sup>改进设计, 将多聚 -HEMA 基质胶溶于无水乙醇, 制备成 10 g/L 的多聚 -HEMA 溶液. 将培养瓶用 PBS 液洗 3 遍, 然后加上 2 ml 多聚 -HEMA 溶液包被瓶底, 无菌状态下风干备用. 每瓶接种 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞, 悬浮培养在 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液中. 在培养箱培养 24 h 后, 离心收集细胞, 70%酒精固定过夜. 碘化丙啶 (PI) 染色后, 采用流式细胞方法检测细胞凋亡指数. 每组检测 5 个标本, 计算均数进行比较.

**1.2.5 裸鼠皮下种植瘤试验.** 构建裸鼠种植瘤模型: 取对数生长期细胞, 台盼蓝染色检测活力在 95%以上, 用无血清 RPMI1640 培养液洗两遍, 制成 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml 细胞悬液, 吸取 0.1 ml (5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个)细胞悬液, 接种于裸鼠颈部皮下. 接种后将裸鼠饲养于层流培养箱中. 定期观察肿瘤生长、动物体重变化及 EAE 评分. 每组细胞分别接种 15 只 BALB/C 裸鼠, 观察 4 周后, 解剖肿瘤及肝肺标本送检病理检查.

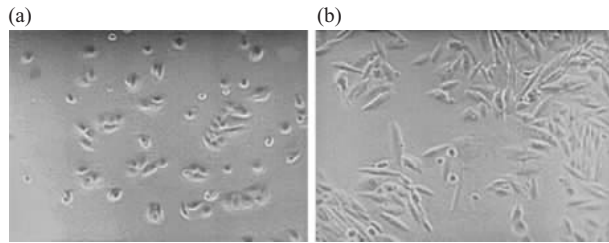
**1.2.6 统计方法.** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 显著性检验采用 *t* 检验, 全部数据采用 Spss11.0 软件分析. 以  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 细胞形态观察

两种细胞均为贴壁生长增殖, 显微镜下连续观察细胞生长和增殖的形态变化, 比较发现, Hs578T/Dox+vector 细胞贴壁形态呈椭圆形或短梭形, 伪足短 (图 1a), caveolin-1 过量表达的 Hs578T/Dox+cav-1 细胞形态发生变化, 贴壁呈长梭形, 伪足长而伸展, 分裂增殖形成的集落呈放射状, 这可能使其具有更好的贴壁生长能力和吸附能

力(图 1b).

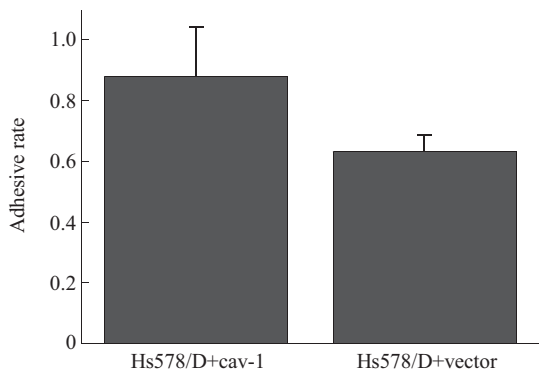


**Fig. 1 Cell form of Hs578T/Dox cells was photographed under a bright-field microscope**

(a) Cell form of Hs578T/Dox cells stably transfected with vector (control). (b) Hs578T/Dox+cav-1 cells showed long and abundant filopodia formation.

## 2.2 细胞粘附试验

细胞粘附于组织基质对于细胞生长和转移具有非常重要的意义,细胞外基质不但对细胞具有连接、支持和保护等物理作用,而且对细胞的形状、分化和迁移等基本生命活动发挥重要的生物影响.在 60 min 体外培养中,乳癌 Hs578T/Dox+cav-1 细胞株与 Matrigel 基质蛋白结合的数量明显高于 Hs578T/Dox+vector 细胞株( $0.897 \pm 0.163$ ) vs ( $0.633 \pm 0.053$ ),  $P < 0.01$ , 图 2), 肿瘤细胞粘附能力的增加使循环中漂流的肿瘤细胞更加容易与血管内皮细胞或组织间质之间建立粘附反应,从而定植下来,这是完成肿瘤转移生长的基础. Caveolin-1 的过量表达显著提高了 Hs578T 耐药细胞株的粘附能力,可以推测,这种变化对于转移细胞与脉管壁或组织表面结合、定植生长,形成新生肿瘤是十分有利的.



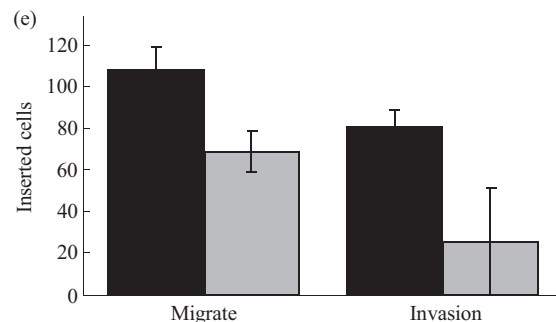
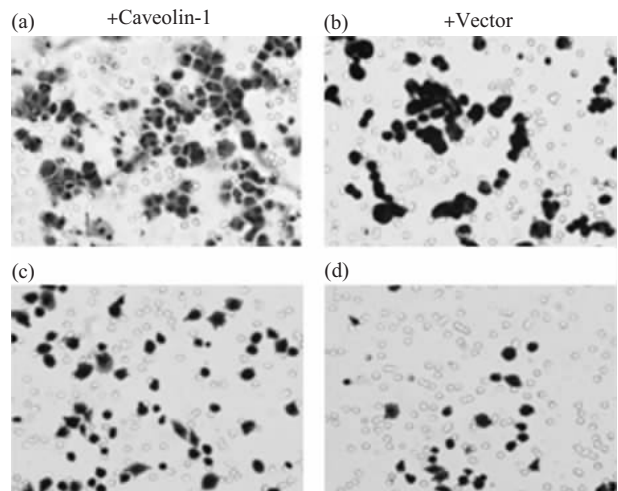
**Fig. 2 Caveolin-1 promoted adhesive rate of Hs578T/Dox cells**

The adhesive rate of Hs578T/Dox cells was quantified as described in methods. Values are  $\bar{x} \pm s$  of five experiments ( $P < 0.01$ ).

## 2.3 细胞迁徙和侵袭试验

肿瘤的转移包括肿瘤侵袭生长和细胞脱落进入

循环流动,与脉管内皮或组织基质粘附,通过组织和间隙变形移动,降解破坏细胞间质和定植生长等主要过程.我们发现乳癌 Hs578T/Dox+cav-1 细胞株的细胞变形迁徙和侵袭破坏能力比 Hs578T/Dox+vector 细胞株明显增强(图 3a~d). 图 3e 显示迁徙和侵袭的定量数据,在迁徙试验中,培养 6 h 后, Hs578T/Dox+cav-1 细胞经变形运动通过微孔,进入膜内的细胞数明显高于 Hs578T/Dox+vector 细胞株( $107.8 \pm 10.9$ ) vs ( $80.8 \pm 8.07$ ),  $P < 0.01$ , 图 3e); 在细胞侵袭试验中, Hs578T/Dox+cav-1 细胞株发挥破坏 Matrigel 基质胶作用,进入微孔膜内的细胞数也高于 Hs578T/Dox+vector 细胞株( $68.8 \pm 9.88$ ) vs ( $25.6 \pm 5.41$ ),  $P < 0.01$ , 图 3e).



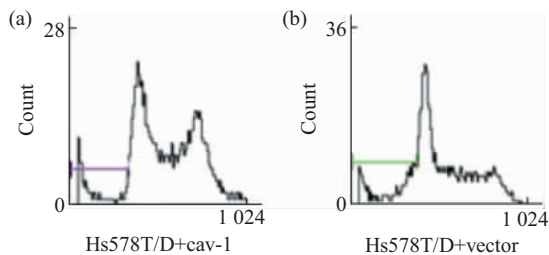
**Fig. 3 Effect of caveolin-1 on cell migration and invasion of Hs578T/Dox cells**

(a),(b) Migration assays were carried out in a 24-well millicell unit on polycarbonate filters with 8- $\mu$ m pores after 6-hour-incubation period. The cells that had passed through the filter into the lower wells were stained and photographed under a bright-field microscope. (c), (d) Invasion was carried out on polycarbonate filters coated with Matrigel. The cells that had passed through the filter were stained and photographed. (e) The migration and invasion was quantified as described in methods. Values of inserted cells are ( $\bar{x} \pm s$ ) of five experiments ( $P < 0.01$ ). ■: Hs578T/Dox+cav-1; □: Hs578T/Dox+vector.



## 2.4 抗失巢凋亡

在肿瘤转移过程中, 实体肿瘤细胞从组织上脱落进入血液或淋巴液等脉管内, 失去了基质的支持, 这些细胞将会诱发程序性死亡, 称为失巢凋亡<sup>[7,8]</sup>. 多聚-HEMA 是一种阴离子聚合物, 铺在培养瓶底可使细胞无法贴壁生长, 在悬浮状态的细胞由于与细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发失巢凋亡<sup>[9,10]</sup>. 体外模拟失巢环境, 观察发现, 悬浮培养的 Hs578T/Dox+vector 细胞散在均匀分布, 较少形成细胞团, 而悬浮培养的 Hs578T/Dox+cav-1 细胞容易聚集, 形成相对较致密的细胞团块. 悬浮培养 24 h, Hs578T/Dox+cav-1 细胞凋亡指数较 Hs578T/Dox+vector 细胞明显下降( $8.79 \pm 1.54\%$  vs  $16.42 \pm 1.42\%$ ,  $P < 0.01$ , 图 4). Caveolin-1 蛋白的过表达使肿瘤 Hs578T 耐药细胞株的抗失巢凋亡能力得到增强, 这为脱落进入血液循环和淋巴循环进行转移的肿瘤细胞在到达转移脏器和重新粘附侵袭形成转移瘤前争取到了更长的时间和更多的机会.



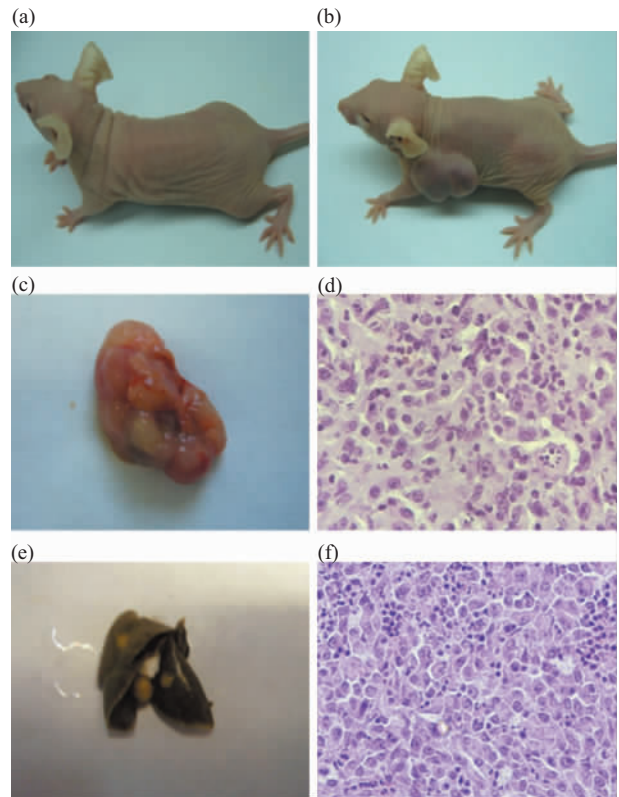
**Fig. 4 Caveolin-1 inhibited anoikis of Hs578T/Dox cells**

Cells were detached and then maintained in suspension in poly-HEMA-coated plastic Petri dishes for 24 h. Apoptosis in Hs578T/Dox+vector and Hs578T/Dox+cav-1 cells were analyzed by flow cytometry (FCM). (a) Hs578T/Dox+vector, AI (apoptosis index): 15.8%. (b) Hs578T/Dox+cav-1, AI: 9.23%.

## 2.5 裸鼠种植瘤

裸鼠皮下接种乳癌 Hs578T/Dox+vector 细胞后, 观察 4 周, 均未形成肿瘤(图 5a). 而 Hs578T/Dox+cav-1 细胞接种 15 只裸鼠, 全部形成肿瘤(图 5b). 移植瘤肿块膨胀侵袭性生长, 突起皮肤表面, 呈不规则圆形. 观察 4 周时, 平均直径( $0.8 \pm 0.45$ ) cm (图 5c). HE 病理染色, 镜下观察, 肿瘤细胞呈弥漫性分布, 大部分为圆形、椭圆形, 部分呈梭形, 细胞核异型性明显, 可见核分裂相, 部分标本中央地图样坏死(图 5d). 一只成瘤裸鼠发生肺转移, 双肺可见多个大小不一的瘤样转移肿块(图 5e). HE 病理检查证实为转移肿瘤组织, 与种植

肿瘤形态相似(图 5f). 可见, caveolin-1 蛋白明显促进了乳癌 Hs578T 耐药细胞株在裸鼠体内的种植成瘤和远处转移.



**Fig. 5 Caveolin-1 promoted tumor formation and metastasis of Hs578T/Dox cells in nude mice**

No tumor formed (a) and tumor formed (b) on BALB/C nude mice bearing human breast Hs578T/Dox+vector and Hs578T/Dox+cav-1 cells on day 28 after the injection, respectively. (c) Tumor of nude mice from (b). (d) HE histological examination of tumor from (c). (e) Lung metastasis tumor from B nude mice. (f) HE histological examination of metastasis tumor from (e).

## 3 讨论

乳癌是女性常见恶性肿瘤, 侵袭转移是肿瘤恶性程度的重要生物学特性和影响肿瘤预后的主要因素. 侵袭转移的深入研究对肿瘤治疗选择和判断预后具有重要意义. 已有报道认为, 乳癌 Hs578T 细胞不能在裸鼠体内成瘤. 本文动物体内种植实验研究发现, 虽然乳癌 Hs578T 耐药细胞株在裸鼠体内不能成瘤, 但过表达 caveolin-1 的 Hs578T/Dox 细胞, 成瘤率达到 100%, 并且发现有肿瘤转移的现象. 这为 caveolin-1 促进肿瘤生长提供了十分有力的证据.

抗失巢凋亡的能力, 是肿瘤细胞通过循环系统扩散和转移的一个先决条件. 肿瘤细胞抗失巢凋亡的意义就在于为这些脱落细胞在定植于转移部位前争取了时间. 我们的研究发现经转染过表达 caveolin-1 的 Hs578T 耐药细胞株具有了更强的抗失巢凋亡能力而更容易存活下来, 这是 Hs578T/Dox+cav-1 在裸鼠皮下种植成瘤和发生肺转移的重要因素之一. Ravid 等<sup>[10]</sup>发现, caveolin-1 也可以抑制乳癌 MCF7 细胞失巢凋亡的发生, 使细胞更利于存活和生长. 作用机制与调控 AKT 信号途径、调节 P53 蛋白和 pp340 蛋白活性, 升高胰岛素样生长因子(IGF-IR)水平有关.

肿瘤侵袭性生长在形态学上的表现为细胞沿肿瘤周围组织间隙、淋巴管、血管和神经鞘膜等呈假蟹足样插入周围组织内, 并破坏原有的周围组织. 超微结构检查证实, 癌细胞的阿米巴运动, 特别是在器官表面的粘附和移动主要依靠丝状伪足的作用, 此外伪足还有支持、摄取营养和吞噬作用. 丝状伪足在癌细胞侵袭的起始阶段可能起主要作用. caveolin-1 过表达使细胞形态呈长梭形变化, 而伪足长而伸展, 形态学变化与细胞侵袭转移能力的增加是一致的. Ho 等<sup>[12]</sup>在肺癌细胞研究中也发现, 具有较强的侵袭转移能力的肿瘤细胞, 具有更加明显的伪足结构, 检测其 caveolin-1 蛋白含量是增加的.

肿瘤侵袭能力的增加有利于破坏肿瘤周围的间质成分及各种物理屏障, 促进肿瘤的转移, 有助于为新生血管和淋巴管提供生长空间, 为肿瘤远处转移创造条件. 粘附能力的增强, 有利于转移细胞在脉管内皮或种植部位组织间质中定植下来. 运动活力的增强使肿瘤细胞更快穿过组织和内皮间隙, 内皮基质广泛暴露并进一步与其结合, 最终形成转移肿瘤团块<sup>[13]</sup>. 我们发现 caveolin-1 表达的增加使乳癌 Hs578T/Dox 细胞的迁徙和侵袭能力明显增强. 但是关于 caveolin-1 对侵袭能力的作用也有一些不同的报道, Lee 等<sup>[14]</sup>报道重组表达 caveolin-1 抑制了 MTLn3 细胞 EGF 受体活性, 细胞伪足难于伸展, 形态由扁平变得圆滑, 体积缩小, 伪足生长减慢, 从而使细胞的迁移能力降低和软琼脂集落形成能力减弱. Hayashi 等<sup>[15]</sup>报道导入突变型 caveolin-1 基因的 NIH3T3 细胞在侵袭小室实验中表现出了增强的侵袭转移能力, 而导入野生型 caveolin-1 基因的 NIH3T3 细胞侵袭能力没有变化.

一些实验结果已经指出, caveolin-1 负调控肿瘤的周期性生长, 并且肿瘤细胞被上调的 caeolin-1

所抑制<sup>[16~18]</sup>. 但并不是所有的研究都支持上述观点, 在一些恶性肿瘤的进展期, 被证明 caveolin-1 对肿瘤的生长有促进作用<sup>[19~21]</sup>. caveolin-1 在肿瘤生长、迁徙和侵袭中是作为一个抑制因子还是促进因子, 尚难有定论. 目前普遍认为这和细胞的来源和生长阶段有关. 所以, caveolin-1 影响肿瘤生物学特征, 发挥作用的具体机制和途径仍有待进一步深入的研究.

## 参 考 文 献

- Hurlstone A F, Reid G, Reeves J R, *et al.* Analysis of the caveolin-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene*, 1999, **18** (10): 1881~1890
- Ravid D, Maor S, Werner H, *et al.* Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Advan Enzyme Regul*, 2006, **46** (1): 163~175
- Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, *et al.* Caveolin and cancer: a complex relationship. In: Mattson M P, ed. *Membrane Microdomain Signaling Lipid Rafts in Biology and Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. 161~190
- Cai C X, Chen J W. Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 2004, **111** (4): 522~529
- Zhu H, Cai C X, Chen J W. Suppression of P-glycoprotein gene expression in Hs578T/Dox by the overexpression of caveolin-1. *FEBS Letters*, 2004, **576** (3): 369~374
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman H K, *et al.* A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*, 1987, **47** (12): 3239~3245
- Frisch S M, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **124** (4): 619~626
- Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (5): 555~562
- Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, *et al.* Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by expression of a mutant c-H-ras oncogene. *J Cell Biol*, 1995, **131** (6 Pt 1): 1587~1598
- Zhu Z, Sanchez-Sweetman O, Huang X, *et al.* Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. *Cancer Res*, 2001, **61** (4): 1707~1716
- Ravi D, Maor S, Werner H, *et al.* Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor- I receptors and signaling. *Oncogene*, 2005, **24** (8): 1338~1347
- Ho C C, Huang P H, Huang H Y, *et al.* Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol*, 2002, **161**(5): 1647~1656
- 高进. 癌的侵袭与转移——基础与临床. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996. 1

- United Publishing House of Beijing Medical University and Peking Union Medical College, 1996. 1
- 14 Lee S W, Reimer C L, Oh P, *et al.* Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1998, **16** (11): 1391~1397
- 15 Hayashi K, Matsuda S, Machida K, *et al.* Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res*, 2001, **61** (6): 2361~2364
- 16 Lee S W, Reimer C L, Oh P, *et al.* Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*, 1998, **16** (11): 1391~1397
- 17 Razani B, Schlegel A, Liu J. *et al.* Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans*, 2001, **29** (pt4): 494~499
- 18 Galbiati F, Volonte D, Liu J, *et al.* Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 2001, **12** (8): 2229~2244
- 19 Fong A, Garcia E, Gwynn L, *et al.* Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol*, 2003, **120** (1): 93~100
- 20 Kato K, Hida Y, Miyamoto M, *et al.* Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer*, 2002, **94** (4): 929~933
- 21 Williams T M, Hassan G S, Li J, *et al.* Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *J Biol Chem*, 2005, **280** (26): 25134~25145

## Promotion of Invasion and Metastasis in Human Breast Carcinoma Hs578T/Dox by Caveolin-1\*

ZHENG Ya-Min<sup>1)</sup>, LI Fei<sup>1)</sup>, QI Bao-Ju<sup>1)</sup>, WU Ping<sup>2)</sup>, SUN Hai-Chen<sup>1)</sup>, LIU Shuang<sup>1)</sup>, CHEN Jian-Wen<sup>2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Department of General Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

<sup>2)</sup>Center For Systems Biology, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** To investigate the effect of caveolin-1 on invasion and metastasis of human breast carcinoma Hs578T doxorubicin-resistant cells, Hs578T/Dox+cav-1 was as experiment group which up-regulated caveolin-1 by introducing the pCI-neo caveolin-1 gene, and Hs578T/Dox+vector introduced the pCI-neo vector was as controlled group. It was revealed that caveolin-1 in Hs578T/Dox cells is an important factor for mediating filopodia formation, which may enhance the invasive of cells. Hs578T/Dox+cav-1 cell formed long and abundant pseudopodia and only few filopodia were detectable in Hs578T/Dox+vector cells. It was shown that adhesive capability of Hs578T/Dox cells enhanced with up-regulated expression of caveolin-1 protein ( $P<0.01$ ). Introducing the caveolin-1 gene into Hs578T/Dox cells enhanced their migration and invasive capability, as revealed by an *in vitro* chamber invasion assay ( $P<0.01$ ). Apoptosis index of Hs578T/Dox+cav-1 group resulting from loss of cell-matrix interactions decreased comparing Hs578T/Dox+vector group ( $P<0.01$ ). Caveolin-1 inhibited anoikis of Hs578T/Dox cells and that allowed survival of cancer cells during systemic circulation, thereby facilitating secondary tumor formation in distant organs. The efficacy *in vivo* of caveolin-1 was tested using cells xenografted into nude mice. Each mouse in both fifteen-mice groups were hypodermically injected with equivalent doses of  $5 \times 10^5$  cells from Hs578T/Dox+cav-1 or Hs578T/Dox+vector. Tumors in Hs578T/Dox+cav-1 group were all formed after injection followed for 4 weeks, while no one in Hs578T/Dox+vector group. Lung metastasis was found in one mouse injected Hs578T/Dox+cav-1 cells. In conclusion, up-regulated caveolin-1 level in Hs578T doxorubicin-resistant cells markedly elevates their capacity to tumor invasion and metastasis.

**Key words** caveolin-1, breast carcinoma Hs578T cells, invasion, metastasis

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30230120).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-64888523, Fax: 86-10-64888513, E-mail: chenmaci@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 19, 2006 Accepted: December 26, 2006