

# HSPA8 在乳腺癌中的表达及其生物学功能

张曼曼<sup>1</sup>, 程政<sup>1</sup>, 周静妮<sup>2</sup>, 郭欠影<sup>2</sup>, 吴正升<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, 合肥 230032;

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230022)

**摘要** 目的 探讨热休克同源蛋白 A8 (HSPA8) 在乳腺癌中的表达及其对肿瘤生物学行为的影响。方法 生物信息学分析和免疫组化实验检测乳腺癌与癌旁非肿瘤乳腺组织中 HSPA8 的表达, 并分析其表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系; Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 HSPA8 表达与乳腺癌患者预后的相关性; 分别构建 HSPA8 敲低与过表达乳腺癌稳转细胞系; CCK-8、克隆形成、Transwell、细胞划痕、Western blot 和免疫荧光实验检测 HSPA8 对乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及其对上皮-间充质转化 (EMT) 的作用。结果 生物信息学分析和免疫组化结果显示, HSPA8 在乳腺癌组织中的表达高于癌旁非肿瘤乳腺组织 ( $P < 0.05$ ), 且其蛋白表达水平与肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移以及 Ki-67 增殖指数均呈正相关 ( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier 生存曲线显示, HSPA8 高表达与乳腺癌患者不良预后相关 ( $P < 0.05$ )。CCK-8、克隆形成、Transwell、细胞划痕、Western blot 和免疫荧光实验结果显示, 敲低 HSPA8 表达能够抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移功能和 EMT ( $P < 0.05$ ); 过表达 HSPA8 能够促进乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移功能和 EMT ( $P < 0.05$ )。结论 HSPA8 在乳腺癌组织中高表达, 与病情进展密切相关, 并且能够促进乳腺癌细胞恶性表型, 可能是乳腺癌治疗的潜在生物靶点。

**关键词** HSPA8; 乳腺癌; 增殖; 侵袭; 迁移; EMT

**中图分类号** R 737.9

**文献标志码** A

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 在全球范围内已确诊的女性癌症病例中约占四分之一。肿瘤的发生发展与细胞的增殖、侵袭及迁移过程紧密相关, 这些过程的异常活化是导致肿瘤复发和转移, 进而产生不良预后的关键因素<sup>[2]</sup>。因此, 寻找与乳腺癌增殖、侵袭及迁移相关潜在生物学标志物具有重要意义。

热休克同源蛋白 A8 (heat shock protein a member 8, HSPA8) 是热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 家族中的一员<sup>[3]</sup>。HSPA8 具有多种生物学功能, 包括参与蛋白质转运、折叠、降解等过程, 并在细胞应激反应中作为分子伴侣发挥作用<sup>[4]</sup>。同时, HSPA8 在多种类型的恶性肿瘤组织中高表达, 并且与患者的预后不良密切相关<sup>[5]</sup>。然而, HSPA8 对乳腺癌发生发展的作用尚未完全明确。该研究旨在分析 HSPA8 在乳腺癌中的表达及其临床意义, 并探讨 HSPA8 表达水平对乳腺癌细胞生物学行为的影响,

以期发现乳腺癌潜在治疗靶点提供实验和理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床病理资料** 收集 2020—2024 年安徽医科大学第一附属医院病理科存档的浸润性乳腺癌 (非特殊类型) 组织蜡块, 共收集 83 例乳腺癌及其相对应癌旁非肿瘤乳腺组织样本 (距离肿瘤边缘  $> 2$  cm), 并整理相关临床病理资料。另收集 10 对新鲜乳腺癌与癌旁非肿瘤乳腺组织临床样本 (组织离体后, 尽快将组织切成直径为 0.5 cm 左右的组织块, 放入组织 RNA 稳定保存液中后放置于  $-20$  °C 冰箱备用)。纳入标准: ① 患者术前未经放疗和化疗; ② 手术切除完整病变并具有明确的术后病理组织学诊断结果。排除标准: ① 患者病历资料不完整; ② 患者合并其他恶性肿瘤。本实验经安徽医科大学第一附属医院临床医学院研究伦理委员会批准 (伦理批号: 2024284)。

**1.1.2 细胞及主要试剂** 人乳腺正常上皮细胞 MCF-10A, 人乳腺癌细胞系 MCF-7、BT474、T47D、MDA-MB-231、SKBR-3、BT549、HCC-1937 和人胚肾

2025-02-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82473059)

作者简介: 张曼曼, 女, 硕士研究生;

吴正升, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

293T 细胞均购自美国 ATCC 公司。RPMI1640 培养基、DMEM 培养基和 DMEM/F12 培养基均购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自长沙赛尔博克斯生物科技有限公司;马血清购自美国赛默飞世尔科技公司;0.25% 胰蛋白酶、1% 青-链霉素、结晶紫溶液、牛胰岛素、表皮生长因子和 RIPA 裂解液均购自上海碧云天公司;CCK-8 试剂盒购自上海陶术生物科技有限公司;PBS 购自无锡耐思生命科技股份有限公司;兔抗人 HSPA8 抗体、鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、上皮细胞钙粘蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) 抗体、神经细胞钙粘蛋白 (neural cadherin, N-cadherin) 抗体、封闭蛋白 1 (claudin-1) 抗体、波形蛋白 (Vimentin) 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体均购自武汉三鹰公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;敲低及过表达 HSPA8 质粒均购自武汉森灵生物科技有限公司;柠檬酸盐修复液粉末购自北京中杉金桥生物公司。

**1.1.3 主要仪器** 细胞计数仪 (型号: JIMBIO FIL, 江苏卓微生物科技有限公司);倒置显微镜激光扫描共聚焦显微镜 (型号: CARL ZEISS, Zeiss LSM 980 with Airyscan 2, 德国卡尔·蔡司公司);台式低速离心机 (型号: TDZ5-WS) 湖南湘立科学仪器有限公司);CO<sub>2</sub> 恒温恒湿培养箱 (型号: IC050, 德国 memmert 公司);转膜槽 (型号: VE-186, 上海天能公司);电泳仪 (型号: DYY-6C, 北京市六一仪器厂);全自动化学发光成像系统 (型号: Tanon 5200, 上海天能公司);多功能酶标仪 (型号: enspire, 美国 MD 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 公共数据库分析** 通过 GEPIA2 数据库对 HSPA8 在乳腺癌和癌旁非肿瘤乳腺组织中基因表达水平进行比较分析;Kaplan-Meier 在线网站分析 TCGA 数据库乳腺癌样本中 HSPA8 mRNA 表达水平与预后的相关性

**1.2.2 免疫组织化学实验** 将收集的临床石蜡样本切片成厚度为 3 μm 的白片,然后进行烤片、脱蜡水化、柠檬酸盐高压修复、使用 3% 过氧化氢酶阻断剂封闭、PBS 冲洗,在 4 °C 下将 HSPA8 兔抗人单克隆抗体 (1:600) 孵育过夜,第 2 天复温后再次进行 PBS 冲洗并滴加二抗山羊抗兔 IgG (1:500) 孵育 30 min, DAB 显色 3 min, 随后苏木精复染、脱水和透明处理,中性树胶封片后通过显微镜观察结果。按照说明书选用已知人卵巢肿瘤组织染色切片作为阳性

对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。HSPA8 阳性染色评分标准以着色强度及着色细胞数综合判断。① 按阳性细胞着色强度计分:未着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;② 按阳性细胞百分比计分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞数 < 25% 为 1 分,25% ~ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。将两项得分结果相加作为最终评分: < 3 分为低表达, ≥ 3 分为高表达<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 细胞培养** MCF-7、BT474 和 BT549 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基中培养;293T、MDA-MB-231、T47D、SKBR-3 和 HCC1937 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素混合液的 DMEM 培养基中培养;MCF-10A 细胞在含有 5% 马血清 + 10 μg/ml 牛胰岛素 + 20 μg/ml 表皮生长因子的 DMEM/F12 培养基中培养。上述细胞均在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于细胞培养箱中。

**1.2.4 慢病毒包装和稳转细胞系的建立** 选择敲低质粒 shHSPA8 (shHSPA8-1 和 shHSPA8-2) 以及空白对照 (sh-Ctrl) 质粒;shHSPA8 序列如下:shHSPA8-1 (5'-ATATGAAACATTGGCCCTTTA-3') 和 shHSPA8-2 (5'-ACAGTGCCAGCTTACTTTAAT-3') 以及过表达质粒 oe-HSPA8 (扩增编码 HSPA8 的 cDNA 序列) 和相对应空白对照 (oe-Ctrl) 质粒,配置病毒包装溶液。将 11.25 μg 携带目的基因的质粒与 3.95 μg 的 ps-PAX 质粒以及 7.5 μg 的 pMD2G 质粒均匀混合,然后依次加入 330 μl 的 0.1 × TE 和 56.5 μl CaCl<sub>2</sub> 溶液,最后使用无菌水将上述混合液补至 570 μl。接着在上述混合液中缓慢滴加 570 μl HBS 溶液,轻轻混匀,于室温下静置 20 min。随后将混合溶液缓慢逐滴加入 293T 细胞中,轻轻摇匀后放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养。收集 24 h 和 48 h 时产生的病毒上清液,使用 0.22 μm 滤膜过滤慢病毒。将收集到的病毒上清液滴加到待转染的细胞中,使用嘌呤霉素筛选成功表达目标基因的细胞,Western blot 检测细胞敲低与过表达效率。

**1.2.5 Western blot** 配置含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解提取细胞总蛋白,制备 10% SDS-PAGE 凝胶电泳板,电泳和转膜时间均为 90 min,脱脂牛奶封闭 2 h。4 °C 下分别孵育一抗 GAPDH (1:5 000) 和 HSPA8 (1:1 000) 过夜。第 2 天,使用 TBST 溶液清洗条带,振荡洗膜 3 次。室温孵育二抗 1.5 h (鼠、兔二抗均按照 1:10 000 在 TBST 中稀释);最后 TBST 溶液洗膜 3 次,使用化学发光仪显影并保存图片。

**1.2.6 克隆形成实验** 使用完全培养基将细胞重悬成单细胞悬液,调整细胞密度,6孔板中每孔中接种800个细胞。10~14 d内持续培养细胞,每隔3 d更换1次培养基。当6孔板中的克隆集落肉眼可见时,停止培养。使用PBS进行2次清洗,4%多聚甲醛固定30 min,使用0.1%结晶紫溶液染色15 min。最后用缓慢流动的水冲洗掉染色液,并倒置孔板,空气干燥后进行拍照保存。

**1.2.7 CCK-8实验** 使用完全培养基将细胞重悬成单细胞悬液,制备成 $1 \times 10^4$ 个/ml的单细胞悬液。取100  $\mu$ l细胞接种于96孔板中,每孔设置4个复孔,接种孔周围1圈加入PBS,细胞贴壁后,按照CCK-8说明书进行配置工作液(1:10),避光条件加入反应1 h。使用酶标仪测定吸收波长为450 nm处的光密度值。随后在24、48、72、96 h时间点测定OD450处的光密度值,测量结束后进行数据统计分析。

**1.2.8 Transwell实验** 细胞饥饿处理12 h后消化后离心,离心机转速设置为1 200 r/min,离心时间为3 min,用无血清培养基将其重悬成单细胞悬液,调整细胞密度至 $5 \times 10^5$ 个/ml。小室下层加入600  $\mu$ l完全培养基,上室接种200  $\mu$ l细胞悬液。(Transwell侵袭实验提前1 h在小室中铺Matrigel基质胶),培养24 h后取出小室进行固定和染色,显微镜下拍照留存。

**1.2.9 细胞划痕实验** 将细胞均匀地铺于6孔板中,待细胞贴壁密度达到90%以上。使用无菌枪头进行划痕处理,PBS清洗细胞后,更换为无血清培养基,并进行拍照记录作为0 h对照。24 h后,挑选3个固定视野进行拍摄,记录划痕愈合情况并进行统计学分析。

**1.2.10 细胞骨架的免疫荧光染色** 提前将无菌细胞爬片置于24孔板中,细胞消化处理后,制备浓度为 $4 \times 10^4$ 个/ml的单细胞悬液,将细胞悬液按照每孔1 ml接种至24孔板中。24 h后取出细胞,弃去培养基,PBS清洗2遍。使用4%多聚甲醛避光固定细胞1 h;每孔加入1 ml Triton-100 PBS溶液室温打孔5 min;1% Triton X-100 通透细胞膜15 min;5% BSA作为封闭液室温封闭1 h;用荧光标记的鬼笔环肽染色1 h;DAPI染色细胞核染色5 min;以上步骤之间均需要用PBS洗3遍,每遍5 min。最后在载玻片上滴加适量防荧光淬灭剂,将细胞爬片无细胞面向上覆盖至载玻片上,避免气泡产生。细胞爬片周围用透明指甲油固定,待指甲油凝固后使用共

聚焦显微镜进行观察并拍照留存。

**1.2.11 统计学处理** 采用GraphPad Prism 8.0软件和SPSS 27.0软件进行数据处理和统计学分析。两组间变量采用独立样本 $t$ 检验;两样本率的比较采用卡方检验或Fisher确切概率检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);两组或多组间多个时间点数据进行分析采用两因素方差分析(two-way ANOVA);所有实验均独立重复3次, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 生物信息学分析 HSPA8 在乳腺癌中的表达及与预后的相关性** 利用GEPIA2数据库分析HSPA8在乳腺癌组织与癌旁非肿瘤乳腺组织的表达差异,结果显示,乳腺癌组织中的HSPA8表达水平高于癌旁非肿瘤乳腺组织( $t = 6.279, P < 0.05$ ,图1A)。应用Kaplan-Meier在线网站分析2 976例乳腺癌患者样本(TCGA)中HSPA8 mRNA与乳腺癌预后的相关性,结果显示,HSPA8 mRNA高表达的乳腺癌患者生存率低于HSPA8 mRNA低表达的患者( $\chi^2 = 15.09, P = 0.0001$ ,图1B)。

**2.2 临床乳腺癌和癌旁非肿瘤乳腺组织中 HSPA8 的表达** 通过免疫组化检测HSPA8在乳腺癌和癌旁非肿瘤乳腺组织中的表达情况,结果显示,HSPA8蛋白主要定位于胞质与胞核中,在肿瘤组织中表达较高,而在癌旁非肿瘤乳腺组织表达较低( $\chi^2 = 38.08, P < 0.001$ ,图2A)。使用Western blot法检测10对新鲜乳腺癌组织与癌旁非肿瘤乳腺组织临床样本中HSPA8的表达,结果显示,HSPA8在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁非肿瘤乳腺组织( $t = 21.92, P < 0.001$ ,图2B)。

**2.3 HSPA8 表达与乳腺癌患者临床病理特征之间的关系** 通过分析不同HSPA8表达分组下乳腺癌患者临床病理特征的相关性,发现HSPA8蛋白高表达与肿瘤大小、淋巴结转移、组织学分级以及细胞核相关抗原(nuclear-associated antigen ki-67, Ki-67)增殖指数均呈正相关性(均 $P < 0.05$ ),而与患者的年龄、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, HER-2)表达均无关(均 $P > 0.05$ ),见表1。

**2.4 HSPA8 在乳腺癌细胞中的表达及稳转细胞系的构建** 采用Western blot检测1株人正常乳腺上

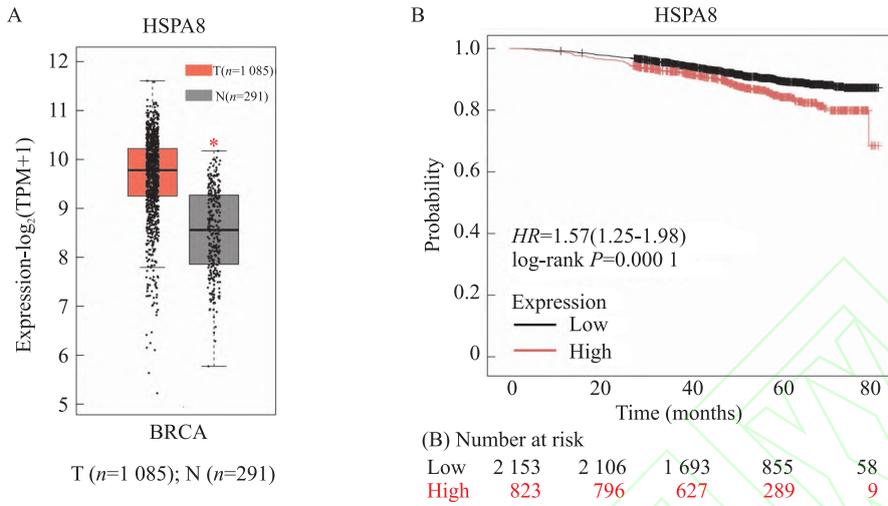


图1 生物信息学分析 HSPA8 在乳腺癌中的表达及与预后的相关性

Fig. 1 Bioinformatics analysis of HSPA8 expression in breast cancer and correlation with prognosis

A: The expression levels of HSPA8 in breast cancer tissues and paraneoplastic non-tumor breast tissues were compared based on the GEPIA2 database; B: The correlation between HSPA8 mRNA expression and clinical survival time in breast cancer patients ( from TCGA ) was analyzed using the Kaplan-Meier Plotter online tool; T: Tumor group; N: Normal group; \*  $P < 0.05$  vs Tumor group.

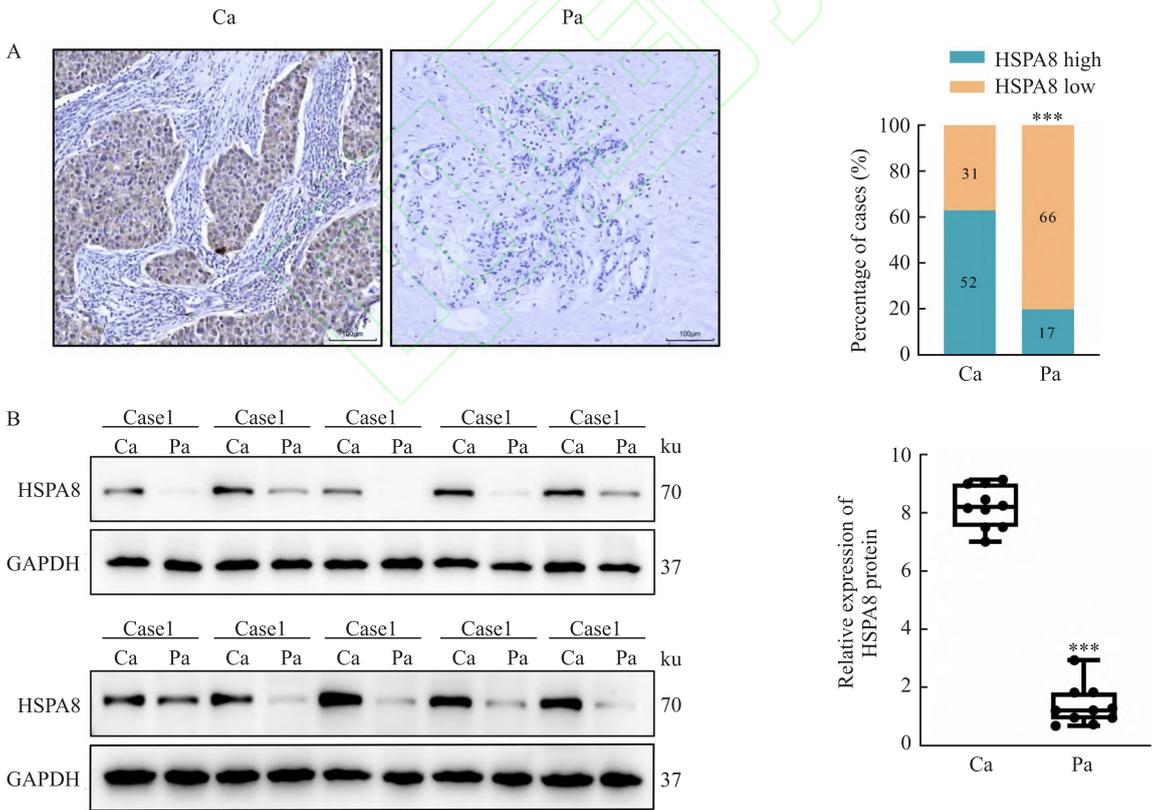


图2 乳腺癌组织及癌旁非肿瘤乳腺组织中 HSPA8 表达

Fig. 2 HSPA8 expression in breast cancer tissues and paraneoplastic non-tumor breast tissues

A: The expression of HSPA8 in breast cancer tissues and paraneoplastic non-tumor breast tissues was detected by immunohistochemistry IHC  $\times 200$ ; B: The protein expression levels of HSPA8 in 10 pairs of fresh breast cancer tissues and paraneoplastic non-tumor breast tissues were detected by Western blot; Ca: Breast cancer tissues; Pa: Paraneoplastic non-tumor breast tissue; \*\*\*  $P < 0.001$  vs paraneoplastic non-tumor breast tissues group.

表1 HSPA8 蛋白表达与乳腺癌患者临床病理特征的相关性  $n$  (%)Tab.1 Correlation between HSPA8 protein expression and clinicopathologic characteristics of breast cancer patients  $n$  (%)

Clinicopathological parameters	HSPA8		$\chi^2$ value	$P$ value
	High expression	Low expression		
Age (years)			0.869	0.648
$\leq 35$	6 (11.5)	5 (16.1)		
36 – 55	37 (71.2)	19 (61.3)		
$> 55$	9 (17.3)	7 (22.6)		
Tumor size (cm)			4.752	0.029
$\leq 2$	13 (25.0)	15 (48.4)		
$> 2$	39 (75.0)	16 (51.6)		
Lymphatic node metastasis			12.401	$< 0.001$
No	8 (15.4)	16 (51.6)		
Yes	44 (84.6)	15 (48.4)		
Histological grading			10.372	0.006
I	3 (5.7)	8 (25.8)		
II	29 (55.8)	19 (61.3)		
III	20 (38.5)	4 (12.9)		
ER			1.162	0.281
Negative	23 (44.2)	10 (32.3)		
Positive	29 (55.8)	21 (67.7)		
PR			0.182	0.670
Negative	21 (40.4)	14 (45.2)		
Positive	31 (59.6)	17 (54.8)		
HER-2			0.042	0.838
Low	23 (44.2)	13 (41.9)		
High	29 (55.8)	18 (58.1)		
Ki-67			14.361	$< 0.001$
$\leq 14\%$	8 (15.4)	17 (54.8)		
$> 14\%$	44 (84.6)	14 (45.2)		

热休克同源蛋白 A8 (HSPA8)

皮细胞与7株人乳腺癌细胞系中HSPA8蛋白表达情况,结果显示,HSPA8在人乳腺癌细胞系中整体表达较高,而在正常细胞中表达较低( $t = 9.49$ 、 $25.06$ 、 $15.11$ 、 $29.31$ 、 $23.51$ 、 $28.62$ 、 $15.42$ ,均 $P < 0.01$ ,图3A);根据不同的乳腺癌细胞系中HSPA8的表达水平情况,选择表达水平较高的MDA-MB-231细胞建立敲低的sh-HSPA8-1、sh-HSPA8-2和sh-Ctrl组稳转细胞系;选择HSPA8表达较低的MCF-7细胞建立过表达oe-HSPA8和oe-Ctrl组稳转细胞系。Western blot结果显示,在MDA-MB-231细胞中,sh-HSPA8-1组和sh-HSPA8-2组较sh-Ctrl组HSPA8蛋白表达水平明显降低( $t = 5.94$ 、 $5.76$ ,均 $P < 0.01$ ,图3B);而在MCF-7细胞中,oe-HSPA8组较oe-Ctrl组HSPA8蛋白表达水平明显提高( $t = 15.3$ , $P < 0.001$ ,图3C)。

**2.5 HSPA8对乳腺癌细胞增殖能力的影响** 使用CCK-8和克隆形成实验检测HSPA8敲低和过表达后乳腺癌细胞增殖能力的差异。CCK-8结果显示,sh-HSPA8-1和sh-HSPA8-2组细胞吸光度均较sh-

Ctrl组明显降低( $t = 4.36$ 、 $3.20$ 、 $9.07$ 、 $6.36$ 、 $9.85$ 、 $7.36$ 、 $13.09$ 、 $9.44$ ,均 $P < 0.05$ ,图4A);而oe-HSPA8组细胞吸光度在48h后较oe-Ctrl组明显提高( $t = 5.36$ 、 $8.97$ 、 $11.74$ , $P < 0.01$ ,图4A)。克隆形成实验结果显示,sh-HSPA8-1和sh-HSPA8-2组细胞克隆形成数目较sh-Ctrl组明显减少( $t = 12.39$ 、 $12.35$ ,均 $P < 0.01$ ,图4B);oe-HSPA8组细胞克隆形成数目较oe-Ctrl组明显增加( $t = 68.00$ , $P < 0.001$ ,图4B)。上述实验结果表明,敲低HSPA8可以抑制乳腺癌细胞增殖能力,而过表达HSPA8可以促进乳腺癌细胞增殖能力。

**2.6 HSPA8对乳腺癌细胞侵袭能力的影响** 通过Transwell实验和细胞划痕实验分别检测HSPA8过表达和敲低对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响。结果显示,sh-HSPA8-1和sh-HSPA8-2组细胞的侵袭和迁移数量均较sh-Ctrl组明显减少( $t = 23.94$ 、 $14.99$ 、 $17.43$ 、 $27.92$ ,均 $P < 0.01$ ,图5A、5B),细胞划痕愈合率下降( $t = 11.85$ 、 $6.58$ ,均 $P < 0.05$ ,图5C);而oe-HSPA8组细胞的侵袭和迁移数

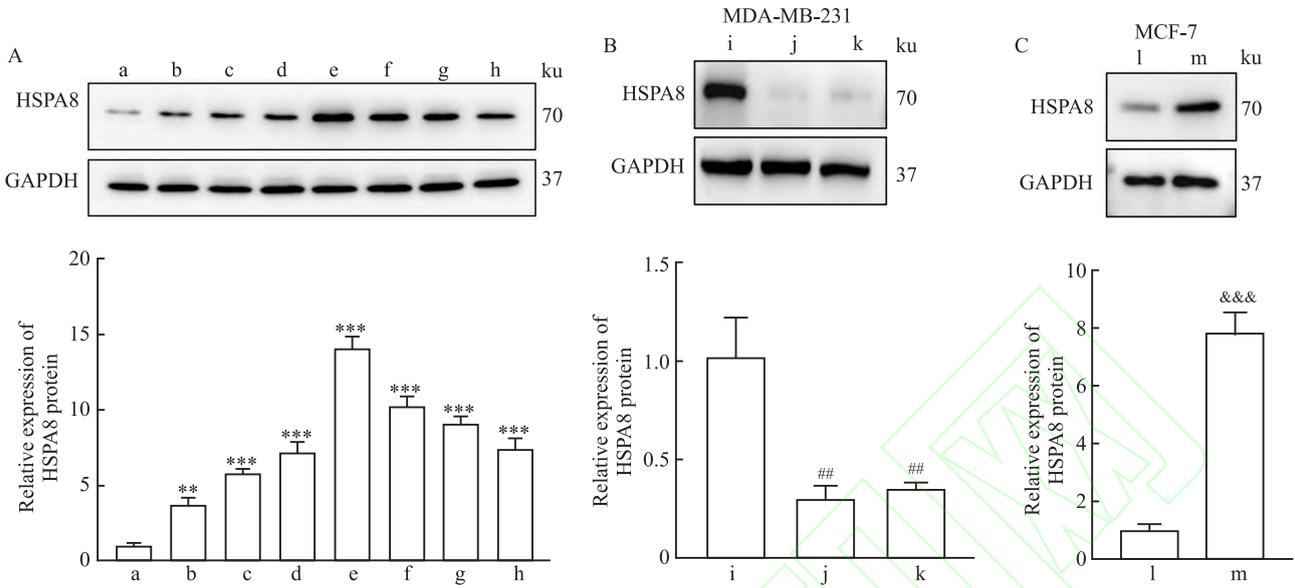


图3 HSPA8在乳腺癌细胞中的表达及稳转细胞系的构建

Fig. 3 Expression of HSPA8 in breast cancer cells and the construction of stable transient cell lines

A: The protein expression levels of HSPA8 in one human normal breast epithelial cell line and seven human breast cancer cell lines were detected by Western blot; B: The protein expression level of HSPA8 in MDA-MB-231 cells was knocked down and detected by Western blot; C: The protein expression level of overexpressed HSPA8 in breast cancer cells was detected by Western blot; a: MCF-10A group; b: MCF-7 group; c: T47D group; d: BT-474 group; e: MDA-MB-231 group; f: SKBR-3 group; g: HCC-1937 group; h: BT-549 group; i: sh-Ctrl group; j: sh-HSPA8-1 group; k: sh-HSPA8-2 group; l: oe-Ctrl group; m: oe-HSPA8 group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs MCF-10A group; ##  $P < 0.01$  vs sh-Ctrl group; &&&  $P < 0.001$  vs oe-Ctrl group.

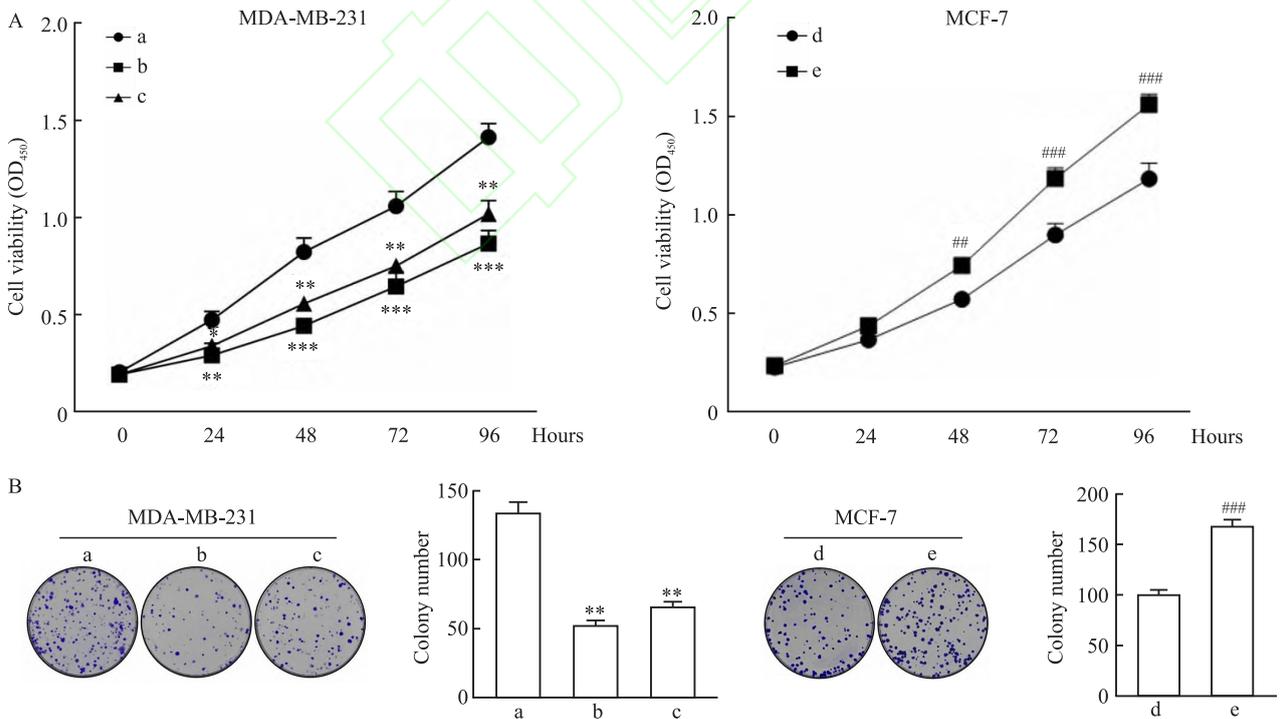


图4 HSPA8敲低与过表达对乳腺癌细胞增殖能力的影响

Fig. 4 Effect of HSPA8 knockdown and overexpression on the proliferative capacity of breast cancer cells

A: The effects of HSPA8 knockdown and overexpression on the proliferative activity of breast cancer cells were assessed by the CCK-8 assay; B: The impacts of HSPA8 knockdown and overexpression on the colony formation ability of breast cancer cells were evaluated by the colony formation assay (with crystal violet staining); a: sh-Ctrl group; b: sh-HSPA8-1 group; c: sh-HSPA8-2 group; d: oe-Ctrl group; e: oe-HSPA8 group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs sh-Ctrl group; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs oe-Ctrl group.

量较 oe-Ctrl 组明显增加 ( $t = 25.92, 49.00$ , 均  $P < 0.01$ , 图 5A、5B), 细胞划痕愈合率升高 ( $t = 7.205$ ,  $P < 0.05$ , 图 5C)。提示敲低 *HSPA8* 可以抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移能力, 而过表达 *HSPA8* 可以促进乳腺癌细胞侵袭和迁移能力。

**2.7 HSPA8 对 EMT 相关蛋白表达和细胞骨架的影响** 使用 Western blot 检测 *HSPA8* 过表达与敲低后乳腺癌细胞 EMT 相关标志物表达的变化, 实验结果显示, 在敲低 *HSPA8* 的细胞中, 间充质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 表达降低, 上皮标志物 Claudin-1 表达上调; 而在过表达 *HSPA8* 的细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 表达上调, E-cadherin 表达下调 (图 6A)。进一步选择 MCF-7 稳转细胞系进行细胞骨架的免疫荧光染色。结果显示, oe-*HSPA8* 组细胞较 oe-Ctrl 组呈间充质表型, 且呈离散型生长 (图 6B)。结果表明, 敲低 *HSPA8* 抑制乳腺癌细胞的 EMT, 而过表达 *HSPA8* 促进乳腺癌细胞的 EMT。

### 3 讨论

尽管近年来乳腺癌的综合治疗技术已取得显著进步, 但部分患者仍然面临转移和复发的难题<sup>[7]</sup>。肿瘤的生物标志物在肿瘤的预防、诊断及治疗中起着至关重要的作用<sup>[8]</sup>, 通过定期检测肿瘤标志物, 可以及时发现肿瘤的复发或转移, 从而采取相应的治疗措施。因此, 寻找与乳腺癌转移和生长相关的生物调控因子对于开发新的治疗策略和改善乳腺癌患者的预后具有重要意义<sup>[9]</sup>。

*HSPA8* 作为一种关键的分子伴侣蛋白, 在维护细胞内蛋白质稳态方面至关重要<sup>[10]</sup>。*HSPA8* 主要在胞质溶胶中发挥作用, 通过与蛋白质的疏水端相互作用, 在 ATP 控制下确保蛋白质的正确折叠和重新折叠, 以及控制异常折叠的蛋白质和过量产生的蛋白质的消除<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明, *HSPA8* 敲低会影响 tau 蛋白、超氧化物歧化酶 1 和  $\alpha$ -突触核蛋白

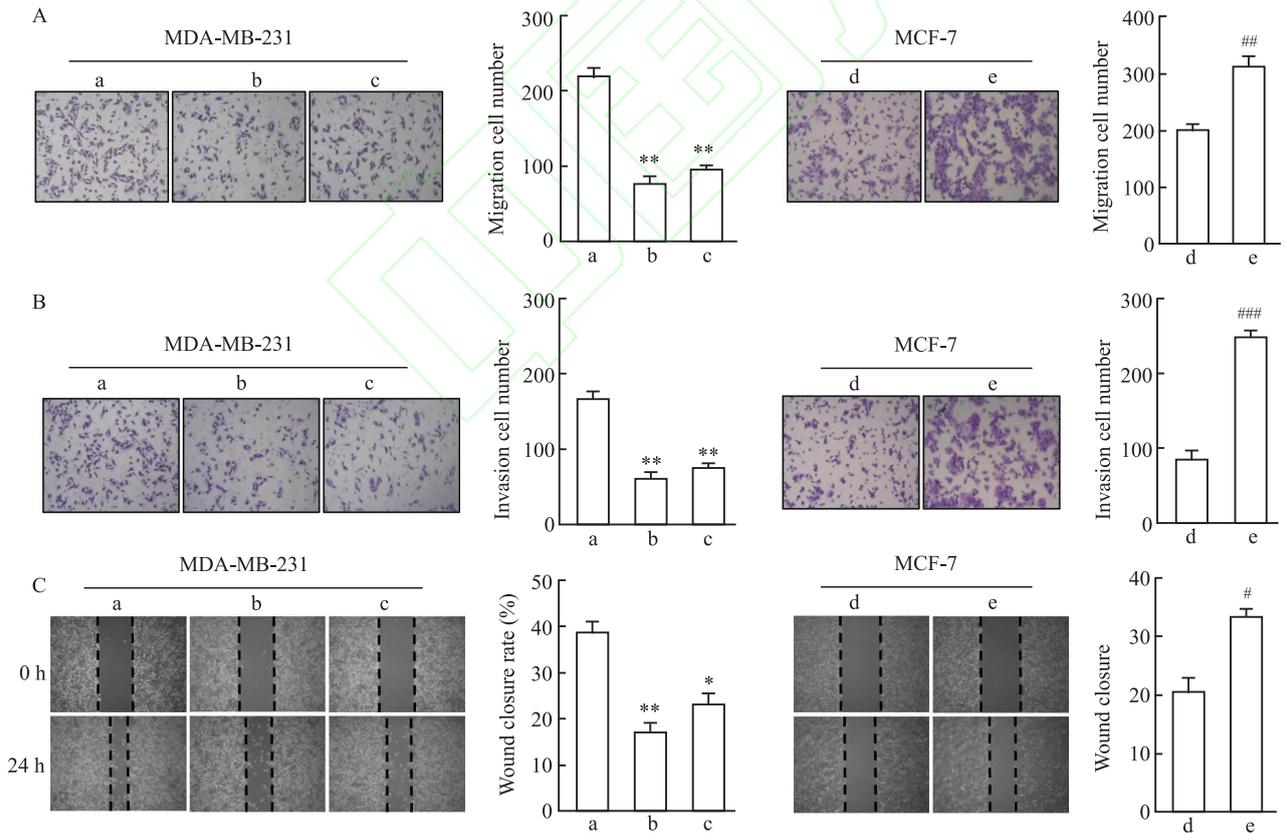


图 5 *HSPA8* 对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响

Fig. 5 Effect of *HSPA8* on the invasion and migration ability of breast cancer cells

A: The effects of *HSPA8* knockdown and overexpression on the migratory capacity of breast cancer cells were evaluated by the Transwell migration assay crystal violet staining  $\times 100$ ; B: The effects of *HSPA8* knockdown and overexpression on the invasive capacity of breast cancer cells were evaluated by the Transwell invasion assay crystal violet staining  $\times 100$ ; C: The effects of *HSPA8* knockdown and overexpression on the wound healing ability of breast cancer cells were evaluated by the scratch assay  $\times 40$ ; a: sh-Ctrl group; b: sh-*HSPA8*-1 group; c: sh-*HSPA8*-2 group; d: oe-Ctrl group; e: oe-*HSPA8* group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sh-Ctrl group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs oe-Ctrl group.

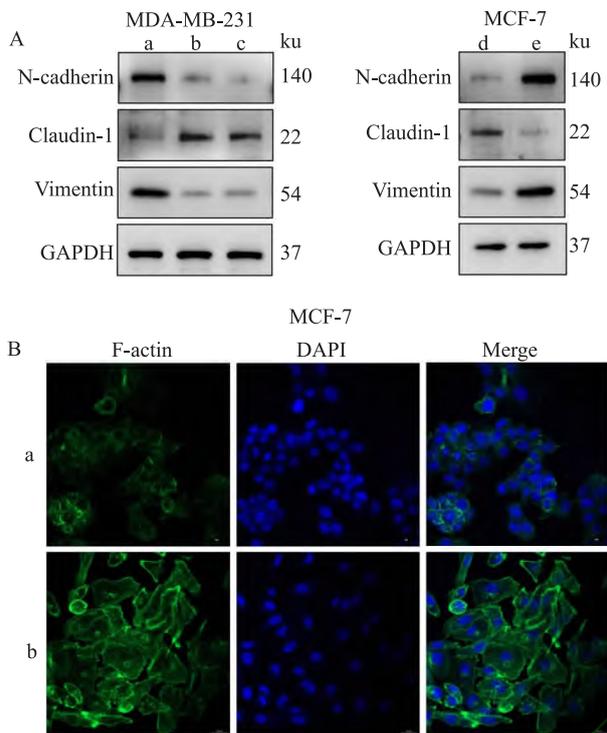


图6 HSPA8对EMT相关蛋白表达和细胞骨架的影响

Fig. 6 Effect of HSPA8 on EMT-related protein expression and cytoskeleton

A: The expression levels of EMT-related proteins in breast cancer cells following *HSPA8* knockdown and overexpression were detected by Western blot; B: The changes in the cytoskeleton of MCF-7 cells following transfection with *HSPA8* were examined by immunofluorescence staining  $\times 200$ ; a: sh-Ctrl group; b: sh-*HSPA8*-1 group; c: sh-*HSPA8*-2 group; d: oe-Ctrl group; e: oe-*HSPA8* group.

的水平,这些蛋白的积累与神经退行性疾病相关,揭示了HSPA8在维持蛋白质稳态中的关键作用。此外,HSPA8在多种癌症的发生和发展中扮演着关键角色,与细胞增殖、转移和自噬等生物过程紧密相关<sup>[13]</sup>。例如,HSPA8能够作为转录因子ETS变体转录因子4(ETV4)的共激活因子,上调pleckstrin同源性样域家族A成员2(PHLDA2)的表达,在体内外促进肝癌的生长<sup>[14]</sup>;在BRAF V600E突变型结直肠癌中,HSPA8转录上调促进了伴侣介导的自噬(CMA)依赖的微囊蛋白1(caveolin-1)降解,释放 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)进入细胞核,激活Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路,从而促进结直肠癌的转移和进展<sup>[15]</sup>。在卵巢癌的研究<sup>[16]</sup>中,HSPA8过表达增强了卵巢癌细胞的转移、侵袭、增殖和成瘤能力,促进EMT进程,激活环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)信号通路并抑制自噬。这些研究结果共同强调了HSPA8作为分子伴侣在细胞生物过程中的重要性,它可能在

多种疾病的发生和发展中都扮演着关键角色。然而,目前关于HSPA8在乳腺癌生物学行为的研究尚少,需要进一步研究探索。

本研究通过生信分析和免疫组化实验发现,HSPA8在乳腺癌组织中呈现高表达,并且HSPA8高表达的乳腺癌患者生存期相对较短,预示着乳腺癌患者的不良预后;通过临床数据分析发现HSPA8的表达水平上调与肿瘤大小、淋巴结转移、组织分级以及Ki-67增殖指数存在显著的正相关性。Ying et al<sup>[17]</sup>在三阴性乳腺癌研究中发现,HSPA8高表达的三阴性乳腺癌患者生存期显著缩短,预后明显较差。另一项针对急性髓系白血病的研究<sup>[18]</sup>表明,与健康对照相比,急性髓系白血病患者中HSPA8的表达水平显著升高,且HSPA8的高表达与较低的总生存率相关,是影响急性髓系白血病患者总生存的独立预后因素。这些研究结果提示HSPA8在包括乳腺癌在内的多种肿瘤发生和发展中扮演着重要角色,HSPA8有望成为评估肿瘤不良预后的潜在生物标志物。为了进一步探讨HSPA8对乳腺癌细胞表型的影响,本研究通过一系列体外实验发现,抑制HSPA8的表达显著降低了乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,并抑制了EMT,而HSPA8的过表达则促进了乳腺癌细胞的恶性生物学功能和EMT。综合以上研究结果,提示HSPA8在乳腺癌的发生发展中可能发挥着促癌作用。

综上所述,该研究初步验证了HSPA8参与乳腺癌细胞的恶性生物学行为和EMT的调控,提示HSPA8可能作为乳腺癌诊治的潜在生物学标志物。然而,目前该研究仅在细胞层面上验证HSPA8在乳腺癌中的表达及其生物学功能,未来需要进一步深入探讨HSPA8在动物模型中的作用及其具体促进乳腺癌增殖和转移的分子机制。

## 参考文献

- [1] Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, et al. Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(17): 4287. doi: 10.3390/cancers13174287.
- [2] Esposito M, Ganesan S, Kang Y. Emerging strategies for treating metastasis[J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(3): 258-70. doi: 10.1038/s43018-021-00181-0.
- [3] Silva N S M, Rodrigues L F C, Dores-Silva P R, et al. Structural, thermodynamic and functional studies of human 71 kDa heat shock cognate protein (HSPA8/hHsc70)[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2021, 1869(12): 140719. doi: 10.1016/j.bbapap.2021.140719.

- [4] Dores-Silva P R, Cauvi D M, Coto A L S, et al. Human heat shock cognate protein (HSC70/HSPA8) interacts with negatively charged phospholipids by a different mechanism than other HSP70s and brings HSP90 into membranes[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(4): 671–84. doi: 10.1007/s12192-021-01210-8.
- [5] Liu Y, Pang Z Q, Wang J S, et al. Heat shock protein family A member 8 is a prognostic marker for bladder cancer: evidences based on experiments and machine learning[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(24): 3995–4008. doi: 10.1111/jcmm.17977.
- [6] Shen Y T, Huang X, Zhang G, et al. Pan-cancer prognostic role and targeting potential of the estrogen-progesterone axis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 636365. doi: 10.3389/fonc.2021.636365.
- [7] Riggio A I, Varley K E, Welm A L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(1): 13–26. doi: 10.1038/s41416-020-01161-4.
- [8] Sarhadi V K, Armengol G. Molecular biomarkers in cancer[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(8): 1021. doi: 10.3390/biom12081021.
- [9] 刘行, 樊双琴, 晏小敏, 等. POLG 抑制剂阻碍线粒体生物合成抑制三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(10): 1720–8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.005.
- [9] Liu X, Fan S Q, Yan X M, et al. POLG inhibitor suppresses migration and invasion of triple-negative breast cancer cells *via* blocking mitochondrial biogenesis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(10): 1720–8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.005.
- [10] Ugalde M V, Alecki C, Rizwan J, et al. Localized molecular chaperone synthesis maintains neuronal dendrite proteostasis[J]. *Res Sq*, 2023; rs.3.rs-3673702. doi: 10.21203/rs.3.rs-3673702/v1.
- [11] Bonam S R, Ruff M, Muller S. HSPA8/HSC70 in immune disorders: a molecular rheostat that adjusts chaperone-mediated autophagy substrates[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 849. doi: 10.3390/cells8080849.
- [12] 唐一鸣, 姚逸飞, 杨中元, 等. 神经退行性疾病相关蛋白病理性质聚集和液相分离研究进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(3): 590–610. doi: 10.12211/2096-8280.2023-005.
- [12] Tang Y M, Yao Y F, Yang Z Y, et al. Pathological aggregation and liquid-liquid phase separation of proteins associated with neurodegenerative diseases[J]. *Synth Biol J*, 2023, 4(3): 590–610. doi: 10.12211/2096-8280.2023-005.
- [13] Tian H, Ding M, Guo Y, et al. Effect of HSPA8 gene on the proliferation, apoptosis and immune function of HD11 cells[J]. *Dev Comp Immunol*, 2023, 142: 104666. doi: 10.1016/j.dci.2023.104666.
- [14] Wang S, Wang Y F, Yang G, et al. Heat shock protein family A member 8 serving as a co-activator of transcriptional factor ETV4 up-regulates PHLDA2 to promote the growth of liver cancer[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2525–36. doi: 10.1038/s41401-023-01133-3.
- [15] Li B, Ming H, Qin S, et al. HSPA8 activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling to facilitate BRAF V600E colorectal cancer progression by CMA-mediated CAV1 degradation[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(3): e2306535. doi: 10.1002/adv.202306535.
- [16] 晏苗苗. HSPA8 促进卵巢癌侵袭转移作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2022. doi: 10.27272/d.cnki.gshdu.2022.001111.
- [16] Yan M M. Study on the role of HSPA8 in promoting invasion and metastasis of ovarian cancer[D]. Jinan: Shandong University, 2022. doi: 10.27272/d.cnki.gshdu.2022.001111.
- [17] Ying B, Xu W, Nie Y, et al. HSPA8 is a new biomarker of triple negative breast cancer related to prognosis and immune infiltration[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 8446857. doi: 10.1155/2022/8446857.
- [18] Li J, Ge Z. High HSPA8 expression predicts adverse outcomes of acute myeloid leukemia[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 475. doi: 10.1186/s12885-021-08193-w.

## Expression of HSPA8 in breast cancer and its biological function

Zhang Manman<sup>1</sup>, Cheng Zheng<sup>1</sup>, Zhou Jingni<sup>2</sup>, Guo Qianying<sup>2</sup>, Wu Zhengsheng<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Pathology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*Dept of Pathology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)*

**Abstract Objective** To investigate the expression of HSPA8 in breast cancer and its effect on tumor biological behaviors. **Methods** Bioinformatics analysis and immunohistochemistry assays were used to detect the expression of HSPA8 in breast cancer and adjacent non-tumor breast tissues, and the relationship between its expression and clinicopathological characteristics of breast cancer patients was analyzed. Correlation between HSPA8 expression and prognosis of breast cancer patients was analyzed by Kaplan-Meier Plotter database. HSPA8 knockdown and overexpression breast cancer stabilized cells were constructed, respectively. CCK-8, clone formation, Transwell, cell scratch, Western blot and immunofluorescence assay were used to detect the effects of HSPA8 on the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells, and its effect on epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Results** Bioinformatics analysis and immunohistochemistry assay revealed that the expression of HSPA8 in breast

# 硼替佐米抑制胰腺癌细胞恶性生物学行为和肝转移

陈崑峰<sup>1</sup>, 黄星<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学医学院, 杭州 310058; <sup>2</sup> 浙江省胰腺病研究重点实验室, 杭州 310009)

**摘要** 目的 探究硼替佐米在抑制胰腺癌细胞恶性生物学行为和肝转移方面的潜能。方法 以 KPC 和 Panc02 细胞为研究对象, 利用 CCK-8 实验用于检测硼替佐米对胰腺癌细胞活力的影响, 并计算半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值; 通过 EdU 染色检测硼替佐米对胰腺癌细胞活力的影响; 凋亡实验用于检测硼替佐米对胰腺癌细胞的促凋亡作用; 集落形成、细胞划痕和 Transwell 实验检测硼替佐米对胰腺癌细胞集落形成、迁移和侵袭能力的影响; qRT-PCR 和 Western blot 用于检测硼替佐米对细胞上皮间质转化 (EMT) 相关标志物分子, 包括 *Cdh1*、*Cdh2*、*Vim* 和 *Snail* 基因, E-cadherin 蛋白 (上皮钙黏蛋白)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 和 Snail 蛋白表达的影响; 动物脾转肝模型用于评估硼替佐米对于抑制胰腺癌肝转移的治疗价值。结果 CCK-8 实验显示硼替佐米能降低胰腺癌 KPC 和 Panc02 细胞的活力 ( $P < 0.0001$ ), IC<sub>50</sub> 值分别约为 118.70 nmol/L 和 34.16 nmol/L; EdU 实验显示硼替佐米能抑制胰腺癌细胞的增殖能力 ( $P < 0.01$ ); 凋亡实验显示硼替佐米能促进胰腺癌细胞发生早期凋亡和晚期凋亡 ( $P < 0.05$ ); 集落形成、细胞划痕和 Transwell 实验显示硼替佐米能抑制胰腺癌细胞的集落形成、迁移和侵袭能力 ( $P < 0.01$ ); qRT-PCR 和 Western blot 实验显示硼替佐米能够改变胰腺癌细胞 EMT 相关标志物分子的 mRNA ( $P < 0.0001$ ) (*Cdh1* 基因表达水平提高, *Cdh2*、*Vim* 和 *Snail* 基因表达水平降低) 和蛋白 (E-cadherin 蛋白水平提高, N-cadherin、Vimentin 和 Snail 蛋白水平降低) 表达; 动物脾转肝模型表明硼替佐米能够有效限制胰腺癌肝转移能力 ( $P < 0.01$ )。结论 硼替佐米能够抑制胰腺癌细胞多种恶性生物学行为和肝转移, 可能是胰腺癌治疗的潜在药物。

**关键词** 硼替佐米; 胰腺癌; 上皮间质转化; 肝转移; 迁移; 侵袭

**中图分类号** R 735.9

**文献标志码** A

2025-02-07 接收

基金项目: 浙江省自然科学基金杰出青年基金项目 (编号: LR22H160010)

作者简介: 陈崑峰, 男, 硕士研究生;

黄星, 男, 博士, 特聘研究员, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: huangxing66@zju.edu.cn

胰腺癌被称为“癌中之王”, 有着较高的发病率和极高的致死率<sup>[1]</sup>。根据最近相关统计数据, 全球胰腺癌新发病例数已达约 49.6 万, 其发病率在所有癌症中位居第十二位, 死亡率为第六位<sup>[2]</sup>。目前, 中国胰腺癌发病率及病死率也逐年增加, 2022 年新发病例人数约为 11.87 万人, 死亡人数约为 10.63

cancer tissues was higher than that in adjacent non-tumour tissues ( $P < 0.05$ ), and its expression level of the protein was significantly and positively correlated with the tumor size, histological grade, lymph node metastasis and Ki-67 proliferation index ( $P < 0.05$ ). The Kaplan-Meier survival curve showed that high expression of HSPA8 was significantly associated with poor prognosis in breast cancer patients ( $P < 0.05$ ). CCK-8, clone formation, transwell, cell scratch, Western blot and immunofluorescence assay showed that knockdown of *HSPA8* expression could significantly inhibit the proliferation, invasion, migration function and EMT of breast cancer cells ( $P < 0.05$ ), while overexpression of *HSPA8* could significantly promote the proliferation, invasion, migration function and EMT of breast cancer cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *HSPA8* is highly expressed in breast cancer tissues, which is closely related to disease progression and the malignant phenotype of breast cancer, suggesting that *HSPA8* may be a potential biological target for breast cancer treatment.

**Key words** HSPA8; breast cancer; proliferation; invasion; migration; EMT

**Found program** National Natural Science Foundation of China (No. 82473059)

**Corresponding author** Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn