文章编号:1000-5404(2005)09-0853-03

论著

BRCA1对MCF-7细胞hTERT基因表达的抑制作用研究

陈 莉,姜 军,杨新华,苏踊跃,陈显春 (第三军医大学西南医院乳腺中心,重庆 400038)

提 要: 目的 将BRCA1真核表达质粒转染人乳腺癌MCF-7细胞中,观察外源性BRCA1基因转染MCF-7细胞后对hTERT蛋白表达的抑制作用及对细胞增殖的影响。**方法** 应用脂质体法将BRCA1真核表达质粒转染至乳腺癌MCF-7细胞中,Western blot检测转染细胞中hTERT蛋白表达的变化。MTT比色试验观察BRCA1真核表达质粒转染后MCF-7细胞增殖活性的变化。**结果** 外源性BRCA1真核表达质粒组MCF-7细胞较未转染组MCF-7细胞hTERT蛋白表达明显减弱。BRCA1基因转染后的MCF-7细胞的增殖活性明显降低。**结论** 外源性BRCA1基因的表达可以抑制人乳腺癌MCF-7细胞中hTERT基因的表达,并抑制MCF-7细胞的增殖能力。BRCA1基因的表达异常可能在乳腺肿瘤发生发展机制中具有重要的作用。

关键词: 人端粒酶蛋白催化亚单位hTERT; 人乳腺癌细胞; MCF-7; BRCA1
中图法分类号: R394.2; R730.23; R734.2 **文献标识码**: A

Inhibition effects of BRCA1 on the hTERT expression of MCF-7 cells

CHEN Li, JIANG Jun, YANG Xin-hua, SU Yong-yue, CHEN Xian-chun (Center of Breast Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To transfect the recombinant eukaryotic expression vector containing BRCA1 cDNA into human breast cancer cell line MCF-7 and explore the effects of exogenous BRCA1 gene on the expression of hTERT protein in MCF-7 cell line. **Methods** pCDNA3.1-BRCA1 plasmid was transfected into MCF-7 cell line by lipofectin reagent. Expression of hTERT protein was determined by Western blotting. The influence of exogenous BRCA1 gene on proliferation of MCF-7 cell were detected by MTT test. **Results** The expression level of hTERT was obviously lower in transfected MCF-7 cell than those in control. Exogenous BRCA1 may inhibit proliferation in MCF-7 cell. **Conclusion** BRCA1 gene may inhibit expression of hTERT gene and proliferation of MCF-7 cell, which plays important part in the carcinogenesis of breast cancer.

Key words: hTERT; human breast cancer cell; MCF-7; BRCA1;

端粒酶是一种目前人体内已知的惟一由小分子RNA和蛋白质构成的具有逆转录酶活性的核糖核蛋白酶。端粒酶活化是细胞发展成为永生化细胞或无限增殖癌细胞的关键步骤,是恶性肿瘤发生发展的重要原因之一[1]。目前研究报道乳腺癌端粒酶活性主要决定于其催化亚单位人端粒逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), hTERT mRNA表达上调不仅与乳腺癌的发生密切相关,而且可能是调节乳腺癌端粒酶活性的限速步骤[2]。乳腺癌易感基因BRCA1(breast cancer susceptibility gene)是近来发现的肿瘤抑制基因,与乳腺癌发生关系密切。近来BRCA1基因与hTERT转录调控关系越来越受关注。乳腺癌细胞中BRCA1蛋白能否影响hTERT的表达及其影响机制目前尚不清楚。本研究将外源性BRCA1基因转染人乳腺癌细胞株MCF-7,观察BRCA1基因转染对hTERT蛋白表达及其对细胞增殖的影响,以期为研究BRCA1在乳腺癌细胞hTERT转录调控中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养基(Gibco公司),新生牛抗血清购自中美合资兰州民海生物制品有限公司,抗BRCA1和hTERT单克隆抗体为Santa Cruz公司产品。乳腺癌细胞系MCF-7(第三军医大学全军免疫学研究所惠赠),pCDNA3.1-BRCA1真核表达质粒由美国Mayo医院YU Xiao-chun博士、Sanyo博士惠赠,脂质体转染试剂Dotap为Roche公司产品。

1.2 细胞培养

乳腺癌MCF-7细胞在含100 ml/L新生牛血清的RPMI1640培养液中按常规方法培养,在6孔培养板中培养1~2 d,待细胞融合度达到60%~70%时进行转染。

1.2.1 pCDNA3.1-BRCA1质粒瞬时转染细胞 采用脂质体转染法,参照Roche公司Dotap试剂说明书进行优化。每孔加入质粒pCDNA3.1-BRCA1 2.0 μg,Dotap 15 μl,设置非转染对照组。

1.2.2 蛋白免疫印迹 转染后48 h,以RIPA裂解液(150 mmol/L NaCl、0.1 g/L NP-40、0.05 g/L脱氧胆汁酸盐钠、0.01 g/L SDS、50 mmol/L Tris HCl (pH 8.0)、2 mg/L亮肽素和100 mg/L苯

作者简介:陈 莉(1972-),女,江苏省南京市人,硕士研究生,主治医师,主要从事乳腺癌早期诊断方面的研究。电话:(023)65398469

收稿日期:2005-01-10;修回日期:2005-03-27

甲基磺酰氟化物)提取细胞总蛋白。采用 BCA 法(美国 Pierce 公司试剂盒)测定总蛋白浓度。总蛋白以每个泳道 30 μg 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后,采用 Bio-Rad 浸渍电转移系统(转移缓冲液:39 mmol/L 甘氨酸,48 mmol/L Tris 碱,0.37 g/L SDS 及 200 ml/L 甲醇)将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(购自北京鼎国生物制品有限公司)。硝酸纤维素膜依次经过封闭、一抗孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育、洗膜,最后以增强化学发光法(ECL,Pierce 公司试剂盒)呈带。蛋白条带采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件进行密度分析。

1.2.3 细胞生长曲线的测定 采用四唑盐(MTT)比色法,分别取 MCF-7 细胞株和经 G418 筛选的 BRCA1 过表达 MCF-7 细胞(已鉴定,另文发表),以 2.5×10^3/孔,3 复孔接种入 96 孔细胞培养板,待细胞生长至第 1~6 天,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,于 37 ℃继续培养 4 h,弃上清后每孔加 DMSO 150 μl,轻轻振荡 10 min,酶标仪(波长 490 nm)测定每孔的吸光度值。

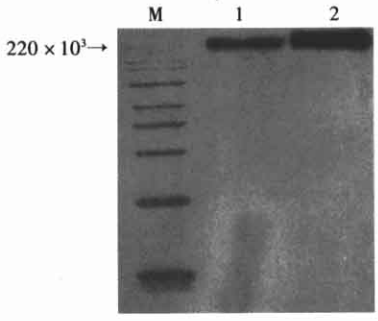
1.3 统计学处理

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 Excel 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot 检测结果

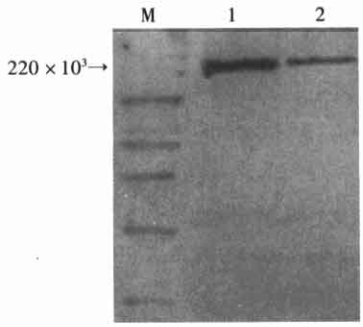
pCDNA3.1-BRCA1 瞬时转染后 48 h,MCF-7 细胞 BRCA1 蛋白表达明显增加(图 1)。同时,pCDNA3.1-BRCA1 转染后 MCF-7 细胞中 hTERT 蛋白表达也发生改变,表现为 pCDNA3.1-BRCA1 转染组 MCF-7 细胞 hTERT 蛋白表达明显减少(图 2)。



M: Marker; 1: Non-transfected; 2: pCDNA3.1-BRCA1 transfected

图 1 转染后的 MCF-7 细胞 BRCA1 蛋白的表达

Fig 1 Expression of BRCA1 protein in MCF-7 cell after transfection



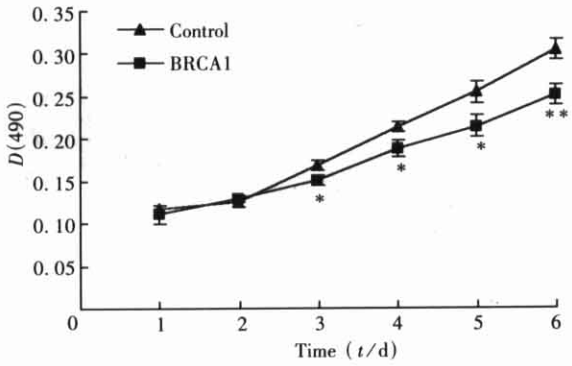
M: Marker; 1: Non-transfected; 2: pCDNA3.1-BRCA1 transfected

图 2 转染后的 MCF-7 细胞 hTERT 蛋白的表达

Fig 2 Expression of hTERT protein in MCF-7 cell after transfection

2.2 BRCA1 基因转染后细胞活性和生长的影响

MTT 比色实验结果显示外源性 BRCA1 基因转入后,MCF-7 乳腺癌细胞株生长活性降低,与对照组相比具有显著差异性($P<0.05$)(图 3)。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 3 BRCA1 转染后 MCF-7 细胞生长的效应改变

Fig 3 Effects of BRCA1 on MCF-7 cell growth after transfection

3 讨论

端粒酶主要成分包括端粒酶 RNA(hTR)、人端粒酶相关蛋白 1(hTP1)和人端粒逆转录酶(hTERT)。端粒酶活性主要决定于催化亚单位 hTERT[3]。有研究表明:hTERT 的启动子在正常人体细胞中是失活的,而在恶性转化的细胞或永生化的细胞中是被激活的,hTERT 启动子的激活是 hTERT 异常表达的前提[4]。因此研究 hTERT 表达调控机制是探讨细胞癌变机制的关键问题之一。

乳腺癌易感基因 BRCA1 是由 1994 年 Miki 等分离克隆,该基因定位于 17q21,约 100×10^3。含有 24 个外显子,最终可编码含 1 863 个氨基酸的蛋白质。大量研究表明,BRCA1 基因结构和功能异常与 80%以上的遗传性乳腺癌和部分散发乳癌发病有密切关系[5]。

近来随着对 hTERT 的转录调控及其相关转录因子的调节机制研究的深入,逐渐把 BRCA1 基因的表达与端粒酶的活性紧密联系在一起。Venkitaraman 等[6]提出 BRCA1 基因参与 DNA 修复和转录调节,并推测 BRCA1 是 hTERT 的抑制因子。Zhou 等[7]研究人类卵巢癌细胞 hTERT 上游 E-box 位点突变时推测 BRCA1 与 hTERT 转录调控密切相关。Kyo 等[8]报道 hTERT 的启动子含有两个 E-box 位点,c-Myc 蛋白能与 BRCA1 蛋白形成异二聚体结合 hTERT 启动子上的 E-box 调控 hTERT 的转录。

以人乳腺癌 MCF-7 细胞株为模型,研究 BRCA1 基因是否对 hTERT 基因表达有明显的抑制作用。本研究将外源性 BRCA1 基因转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,

Western blot 结果显示转染后 hTERT 蛋白表达明显减少，证明了 BRCA1 基因可以显著抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞中的 hTERT 基因表达，同时发现外源性 BRCA1 基因转染人乳腺癌 MCF-7 细胞后，细胞的 MTT 活性明显抑制，可能对 MCF-7 细胞的增殖也有一定的影响。我们的研究已经明确在乳腺癌细胞中，BRCA1 基因的表达可以抑制 hTERT 的转录，BRCA1 基因表达异常对 hTERT 转录活性抑制能力的减弱可能是乳腺癌发生或发展的重要机制之一。为进一步研究 BRCA1 蛋白参与 hTERT 转录调控的机制，及其是否通过与 c-Myc 或其它转录因子作为桥梁间接作用于 hTERT 启动子，影响其转录活性的研究奠定了基础。也利于今后对乳腺癌发病机制的认识和早期的预警及诊断。

参考文献：

[1] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al*. Telomerase catalytic submit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5328): 955 - 959.

[2] Bieche I, Nogues C, Paradis V, *et al*. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2): 452 - 459.

[3] Tzukerman M, Shachaf C, Ravel Y, *et al*. Identification of a novel transcription factor binding element involved in the regulation by differentiation of the human telomerase promoter[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11(12): 4381 - 4391.

[4] Cong Y S, Wen J, Baccheti S, *et al*. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characteristic of the promoter[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(1): 137 - 142.

[5] Jhamwar Uniyal M. BRCA1 in cancer cycle and genomic stability[J]. Front Biosci, 2003, 8: S1107 - S1117.

[6] Venkitaraman A R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2[J]. Cell, 2002, 108(2): 171 - 182.

[7] Zhou C, Liu J. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by BRCA1 in human ovarian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(1): 130 - 136.

[8] Kyo S, Takakura M, Taira T, *et al*. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(3): 669 - 677.

（编辑　陈聪连）

（上接 852 页）

由于新生鼠 IL-4 含量较少[11]，故采用 ELISA 方法在各组均未检测出 IL-4。

表 1　各组新生仔鼠 OVA 特异性淋巴细胞增殖反应结果

组别	n	SI($\bar{x} \pm s$)
Ⅰ	9	0.99 ± 0.35
Ⅱ	8	1.66 ± 0.70
Ⅲ	9	4.40 ± 2.86*
Ⅳ	10	1.29 ± 0.22

*：与Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ组比较，$P < 0.05$

表 2　各组新生仔鼠脾淋巴细胞培养上清中 IFN-γ 水平

组别	n	IFN-γ(pg/ml)($\bar{x} \pm s$)
Ⅰ	9	1 580.61 ± 1 447.60
Ⅱ	8	608.97 ± 1 397.27
Ⅲ	9	66.38 ± 31.12*
Ⅳ	10	1 293.25 ± 1 166.29

*：与Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ组比较，$P < 0.05$

3　讨论

目前治疗食物过敏惟一有效的方法是严格避免特定食物抗原的摄入，因此早期预防食物过敏发生显得尤其重要，特别是在"窗口期"阻断致敏的发生将对降低儿童食物过敏的发生起关键作用。有报道指出妊娠期食物抗原暴露可引起胎鼠宫内致敏，但对于致敏发生在妊娠哪一阶段尚不清楚。

本研究结果显示妊娠晚期注射组的新生仔鼠出现 OVA 特异性淋巴细胞增殖反应的增强和 Th1 免疫应答的抑制（表现为 IFN-γ 水平显著下降），提示食物抗原引起的宫内致敏窗口期为妊娠晚期，这与国外报道相符；Jones 等[4]发现在妊娠期内胎儿的淋巴细胞就可对食物抗原出现增殖反应，并且妊娠第三阶段较第二阶段的增殖率高。但国外学者多采用的是对不同出生季节和不同胎龄婴儿的脐血进行分析后得出以上结论。而本研究采用的是对妊娠期母鼠直接进行抗原给予后，检测仔鼠的免疫功能，其优点在于：①排除母体因素的沾染；②能直接使不同妊娠期的实验对象暴露于抗原中，因而能更有效地寻找致敏窗口期。

本研究通过对妊娠不同时期母鼠食物抗原暴露研究发现，母亲妊娠期 OVA 暴露可通过胎盘致敏小鼠，致敏的窗口期主要在妊娠晚期。因此，为了预防食物过敏的发生，在有过敏性疾病家族史的母亲妊娠晚期适当限制某些食物蛋白摄入对于减少后代过敏性疾病发生可能会有一定的作用。

关键词：食物抗原暴露；孕期；卵清白蛋白；致敏窗口期
中图法分类号：R593.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Holt P G, McMenamin C, Nelson D. Primary sensitization to inhalant allergens during infancy[J]. Pediatr Allergy Immunol, 1990, 1(3): 3 - 13.

[2] Knippels L M, Penninks A H, Spanhaak S, *et al*. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model[J]. Clin Exp Allergy, 1998, 28(3): 368 - 375.

[3] Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans[J]. Immunol Today, 1999, 20(7): 330 - 335.

[4] Jones A C, Miles E A, Warner J A, *et al*. IFN gamma production and proliferative responses from fetal leucocytes during 2nd and 3rd trimester of pregnancy[J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95(2): 380 - 384.

（编辑　陈聪连）