论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1438-03

# 乳腺癌细胞过表达 iASPP 对顺铂作用的影响

李 强[1],程 湘[2],孙守勋[1],刘 莹[1] (第三军医大学新桥医院:[1]检验科,[2]妇产科,重庆 400037)

摘 要:目的 构建过表达 iASPP 的乳腺癌细胞株,分析过表达 iASPP 对顺铂(cis-dichlorodiamine platinum,DDP)作用下乳腺癌细胞的影响。方法 采用 RT-PCR 方法在乳腺组织中扩增出 iASPP,转染入 MCF-7,G418 筛选获得过表达 iASPP 的乳腺癌细胞株,MTT 和流式细胞仪分析过表达 iASPP 的乳腺癌细胞株在 DDP 作用下增殖和凋亡情况。结果 成功构建了过表达 iASPP 的乳腺癌细胞株,过表达 iASPP 可明显降低 DDP 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用($P<0.01$),并降低细胞凋亡的百分数($P<0.01$)。结论 过表达 iASPP 可以明显降低乳腺癌细胞 MCF-7 对 DDP 作用的敏感性。

关键词:iASPP;顺铂;乳腺癌细胞
中图法分类号:R73-354;R737.9;R979.11 文献标识码:A

# Effect of overexpressed iASPP on breast cancer cell line MCF-7 exposed to cisplatin

LI Qiang[1], CHENG Xiang[2], SUN Shou-xun[1], LIU Ying[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Gynaecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To analyze the effects of overexpressed iASPP on breast cancer cell line MCF-7. Methods The iASPP cDNA was obtained from breast carcinoma tissue by RT- PCR. The breast cancer cell line MCF-7 that overexpressed iASPP was established by stable transfection and G418 selection. The proliferation and apoptosis of the MCF-7 cells that overexpressed iASPP after exposure to cisplatin were detected by MTT and flow cytometry. Results The MCF-7 cells that overexpressed iASPP were successfully constructed. Overexpressed iASPP could significantly decrease the apoptosis rate of MCF-7 cells exposed to cisplatin and weaken the inhibitory effects of DDP on the proliferation of MCF-7 cells. Conclusion Overexpressed iASPP attenuates the sensitivity of human breast cancer cell line MCF-7 to cisplatin.

**Key words**: iASPP; cisplatin; breast cancer cell

顺铂(cis-dichlorodiamine platinum,DDP)是临床广泛使用的抗肿瘤基础药物之一,目前认为 DDP 可以诱导 p53 基因的表达,当 p53 被激活后,可诱导细胞生长停滞、衰老、分化、凋亡,这可能是 DDP 抗肿瘤的细胞凋亡机制之一[1,2]。p53 是重要的抑癌基因之一,新近发现的 ASPP(apoptosis stimulating protein of p53)家族是能特异性地调节 p53 抑癌功能的蛋白质[3,4],其中 iASPP(inhibitory member of the ASPP family)与 p53 结合能干扰 p53 的细胞凋亡能力。研究还显示在肿瘤中有少量的 ASPP1 和 ASPP2 的表达下降,但是以 iASPP 表达明显增高为主[5]。乳腺癌细胞中 iASPP 的高表达作用和机制并不清楚。本研究通过构建高表达 iASPP 的乳腺癌细胞株,分析过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞的影响,探讨 DDP 临床耐药的原因,为乳腺癌的治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 大肠杆菌 DH5α 菌株、MCF-7 细胞均由本室保存;pcDNA3.0 真核表达质粒购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 引物及主要试剂 PCR 引物(上海生工生物工程公司),*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶(New England),$T_4$ DNA 连接酶(Promega 公司),G418、MTT、脂质体(Invitrogen 公司),细胞培养液、FBS(Gibco 公司),DDP(Sigma 公司,美国),抗 iASPP 抗体由卢欣教授提供(本校特聘海外教授),其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.0/iASPP 质粒的构建 乳腺癌标本来自手术切除组织,取约 100 mg 组织标本,匀浆至组织完全裂解,用 Tripure 试剂提取 RNA,标准 RT-PCR 进行扩增,上游引物 5′-GCCAAGCTTATGTGGATGAAGGACCCTGT-3′,下游引物 5′-GCGGAATTCTCAGACTTTACTCCTTTGAGGCTTCACCCTG-3′。产物双酶切后连接到载体质粒 pcDNA3.0 上,然后转化到 DH5α 中,阳性克隆为相应的内切酶消化,电泳鉴定与插入片段大小相

基金项目:国家自然科学基金(30500622)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500622)
作者简介:李 强,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68774702,E-mail:liqiangpei@163.com
收稿日期:2007-09-03;修回日期:2007-11-09

同,最后送公司进行全自动测序仪自动测序鉴定,并用 BLAST 进行基因比对。

1.2.2　MCF-7 细胞的培养　　取液氮冻存的 MCF-7 细胞复苏,接种于含 10% FBS 的 Eagle 's MEM 常规培养基中,另分别加 100 U/ml 的青霉素和链霉素,5% $CO_2$、37 ℃恒温恒湿培养,每 1 ~ 2 天更换培养基。

1.2.3　细胞的转染和筛选　　按 Gibco 公司 Lipofectamine2000 试剂盒使用手册进行转染。已在细胞瓶中长满的 MCF-7 用胰酶消化收集后计数,按 $4 \times 10^5$ 个/孔接种至 6 孔细胞板,10% FBS 无抗生素的 DMEM 培养基培养至 70% ~ 80% 满密度(18 ~ 24 h),取 1 μg pcDNA3.0/iASPP 质粒(pcDNA3.0载体质粒为对照)DNA 加 2 μl 的 Lipofectamine2000 进行转染实验。每孔加 0.8 ml 无血清、无抗生素的培养基,转染 5 h 后每孔补加 1 ml 含 15% FBS 的 DMEM,培养 36 h 后,将 G418 浓度为调整到 1 000 μg/L 继续培养,筛选 4 周后,阳性细胞大量扩增,用于实验。

1.2.4　RT-PCR 检测 iASPP 表达　　以 β-actin 为内参照,RT-PCR 检测转染载体质粒和 pcDNA3.0/iASPP 后,筛选到细胞中 iASPP RNA 的表达。iASPP 上游引物 5′-CCCCCATCACTGAGGGAT-3′,下游引物 5′-GCCCCGTCCCAGAGCAGCCC-3′;β-actin 上游引物 5′-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3′,下游引物 5′-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3′。

1.2.5　Western blot　　G418 筛选阳性的 MCF-7 细胞总蛋白提取按分子克隆实验指南[6]蛋白提取方法进行,100 μg 的总蛋白在 10% SDS-PAGE 中电泳,半干电转仪上转膜,5% 的低脂牛奶中封闭。染色反应按试剂盒说明书进行,抗体稀释度为 1∶500。

1.2.6　MTT 实验检测细胞增殖　　MCF-7 细胞、转染 pcDNA3.0载体的 MCF-7 细胞、过表达 iASPP 的 MCF-7 细胞按 8 000个/孔,加入浓度分别为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/ml 的 DDP,每组 6 孔,接种于 96 孔培养板中,按前述适宜条件培养 24 h 后,加入 20 μl MTT(4 mg/ml),37 ℃稳育 8 h,去掉上清液,加入 200 μl 二甲亚砜,最后在波长 600 nm[$D$(600)]处比色。按公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 = [1 - 实验组平均 $D$(600)/对照组平均 $D$(600)] × 100%。

1.2.7　流式细胞仪分析细胞周期分布和凋亡　　根据 MTT 结果选取,DDP 浓度 5.0 g/ml 作用 48 h 后收获细胞,用流式细胞仪分析细胞周期分布与凋亡率。

### 1.3　统计学方法

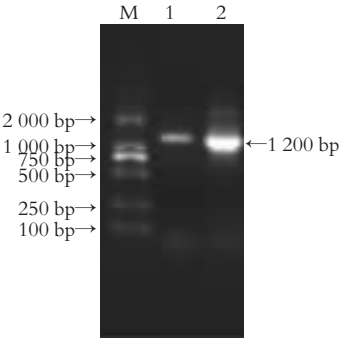
采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,多组均数间比较采用方差分析,均数间的两两比较采用 LSD 方法,单样本用 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　表达 iASPP 的乳腺癌细胞株的建立

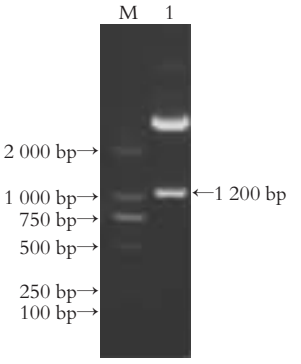
2.1.1　RT-PCR 扩增 iASPP cDNA 结果　　取 RT-PCR 产物各 5 μl 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,结果显示在突变体构建中,PCR 产物在相应相对分子质量处均有一条带,与预期构建 ERR1 突变体的片段大小一致(图 1)。

2.1.2　pcDNA3.0/iASSP 阳性质粒的鉴定　　重组的 pcDNA3.0/iASSP 质粒用 *Eco*R Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切(图 2),可以切出与目的片段大小一致的插入片段,可以初步认为其为阳性克隆。阳性重组质粒通过测序进行进一步验证,证实上述所得的质粒正确克隆了 iASSP 编码区 cDNA,插入方向及阅读框均正确。




M:DNA 标准(DL 2000);1,2:iASPP

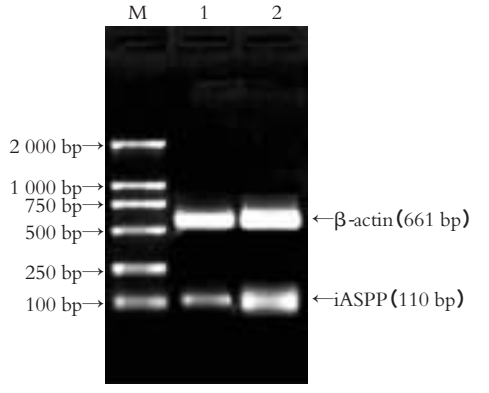
**图 1　iASPP cDNA 的 RT-PCR 扩增产物电泳图**




M:DNA 标准(DL 2000);1:pcDNA3.0/iASPP

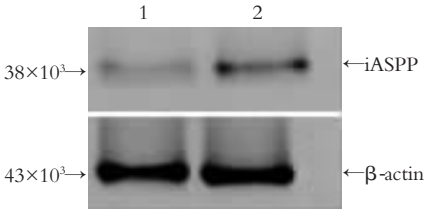
**图 2　*Eco*R Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定**

2.1.3　过表达 iASPP 的 MCF-7 细胞的鉴定　　为了获得高表达 iASPP 的 MCF-7 细胞株,我们将 pcDNA3.0/iASPP 质粒转染 MCF-7 细胞,1 000 μg/L 的 G418 筛选 4 周以上。提取所获得的 G418 阳性细胞的总 RNA,通过 RT-PCR 分析 iASPP mRNA 的表达(图 3),筛选到的转染 pcDNA3.0/iASPP 质粒的 MCF-7 细胞表达的 iASPP mRNA 明显高于对照(转染 pcDNA3.0 载体的 MCF-7 细胞),表明我们初步获得 iASPP mRNA 高表达细胞株。为了进一步验证我们筛选得到的阳性细胞中 iASPP 蛋白是否高表达,我们又用抗 iASPP 抗血清进行 Western blot 实验,检测 iASPP 的蛋白表达情况(图 4),筛选到的转染 pcDNA3.0/iASPP 质粒的 MCF-7 细胞 iASPP 蛋白水平的表达明显高于对照($P < 0.05$),上述实验表明我们筛选得到了高表达 iASPP mRNA 的 MCF-7 乳腺癌细胞株。




M:DNA 标准(DL 2000);1:质粒对照;2:转染 pcDNA3.0/iASPP

**图 3　RT-PCR 分析 iASPP mRNA 在转染乳腺癌细胞的表达**




1:质粒对照;2:转染 pcDNA3.0/iASPP

**图4 Western blot 分析 iASPP 蛋白在转染乳腺癌细胞的表达**

### 2.2 过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞的影响

2.2.1 MTT 法检测过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞的增殖抑制 浓度分别为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μg/ml 的 DDP 作用 24 h 后,转染 pcDNA3.0 的对照细胞 $D$(600)随浓度下降,呈剂量依赖性;转染 pcDNA3.0/iASPP 的实验组细胞 $D$(600)明显低于各浓度对照($P<0.05$);转染 pcDNA3.0/iASPP 的实验组对应对照的生长抑制率明显增加,呈剂量依赖性。上述结果说明转染 pcDNA3.0/iASPP 后,iASPP 的过表达明显抑制了 DDP 的作用(表1)。

**表1 过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)**

| DDP(μg/ml) | $D$(600) | | 抑制率(%) |
|---|---|---|---|
| | pcDNA3.0 载体 | pcDNA3.0/iASPP | |
| 0.0 | 1.687±0.125 | 1.706±0.135 | |
| 0.5 | 1.536±0.128 | 1.677±0.164[a] | 9.20 |
| 1.0 | 1.456±0.136 | 1.647±0.147[a] | 13.10 |
| 2.5 | 1.321±0.174 | 1.576±0.198[a] | 19.30 |
| 5.0 | 1.146±0.206 | 1.487±0.242[a] | 29.80 |
| 10.0 | 0.978±0.245 | 1.347±0.278[a] | 37.70 |

a:$P<0.05$,与 pcDNA3.0 载体比较

2.2.2 流式细胞仪分析过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞周期和凋亡的影响 转染 pcDNA3.0 载体的对照组细胞在 DDP 作用下与不加 DDP 相比,48 h 后显示 $G_2$/M 期细胞明显增多,$G_1$期细胞比例减少,凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。而过表达 iASPP 的实验组与转染 pcDNA3.0 载体的对照组细胞在 DDP 作用下,显示 $G_2$/M 期细胞明显降低,$G_1$期细胞比例增高,凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明过表达 iASPP 降低了乳腺癌细胞对 DDP 的敏感性(表2)。

**表2 48 h 后过表达 iASPP 对 DDP 作用下乳腺癌细胞周期和凋亡的影响(%,$\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | $G_1$ | S | $G_2$/M | 凋亡率 |
|---|---|---|---|---|
| pcDNA3.0 载体 | 55.42±4.21 | 30.55±3.88 | 14.03±2.10 | 1.82±0.56 |
| pcDNA3.0 载体+DDP | 38.18±4.56[a] | 16.25±1.14 | 45.57±4.68[a] | 17.56±3.54[a] |
| iASPP+DDP | 50.62±3.89[b] | 25.68±2.16 | 23.70±3.18 | 5.23±2.14[b] |

a:$P<0.05$,与 pcDNA3.0 载体比较;b:$P<0.05$,与 pcDNA3.0 载体+DDP 比较

## 3 讨论

顺铂(DDP)耐药可能与耐药基因的过表达有关,同时也与顺铂作用机制中某些信号转导的改变有关。对顺铂耐药机制进行有效干预,可望增强顺铂的疗效。若 p53 基因突变,采用顺铂治疗乳腺癌时,尽管有大量 p53 表达,但突变的 p53 蛋白并无活性,也可导致顺铂治疗失败。由此看起来 p53 的突变可引起顺铂治疗无反应性,但对许多肿瘤的分析结果显示:在半数肿瘤中 p53 有突变,而 p53 的突变 5% 发生在调节区,95% 发生在中心区域。研究表明,p53 在中心区域外的突变在对 p53 丧失细胞凋亡功能中起重要作用,绝大部分突变并不影响 p53 诱导的细胞凋亡功能[7]。因此 p53 突变并不是导致顺铂治疗乳腺癌无反应的主要原因,也有人认为 p53 的抑制蛋白的过度表达或 p53 的共刺激因子的缺乏才是引起 p53 抑癌功能丧失的主要原因。这些 p53 抑制蛋白的过度表达或 p53 共刺激因子的缺乏可能才是导致顺铂治疗乳腺癌无反应的重要原因[8]。找到这些抑制蛋白或共刺激因子并对其进行相应的干预,则可能提高顺铂治疗乳腺癌的疗效。

ASPP(ankyrin repeat, SH3 domain, praline domain-rich containing proteins)蛋白家族是与 p53 功能活性密切相关的一组蛋白。目前已经鉴定的家族成员有 ASPP1、ASPP2 和 iASPP。ASPP 与 p53 结合形成 ASPP-p53 复合物,增强 p53 与 DNA 的结合能力,促进 p53 凋亡基因启动子的活化,增强 p53 的细胞凋亡功能,使细胞程序性死亡,以清除机体内多余的细胞。iASPP 在人类是由 PPP1R13L 基因编码的,有 315 个氨基酸组成,是一个 p65 结合蛋白,它的功能是同 ASPP1、ASPP2 竞争性的与 p53 的结合位点结合,阻止 p53 的细胞凋亡功能,从而抑制 p53 的抑癌功能[3,4]。

本实验结果显示过表达 iASPP 的乳腺癌细胞在顺铂的作用下,细胞凋亡明显被抑制。由此推测乳腺癌中 iASPP 的高表达能抑制 p53 引起的乳腺癌细胞凋亡,阻断顺铂诱导的通过 p53 诱导的乳腺癌细胞的凋亡信号通路,可能是顺铂治疗无反应的重要原因,而降低 iASPP 的表达能促进 p53 诱导的乳腺癌细胞凋亡功能。因此,如果抑制乳腺癌细胞中的 iASPP 表达,就能增进顺铂的治疗效果,则可望提高乳腺癌的治疗水平。

## 参考文献:

[1] Lee Y J, Doliny P, Gomez-Fernandez C, *et al*. Docetaxel and cisplatin as primary chemotherapy for treatment of locally advanced breast cancers[J]. Clin Breast Cancer, 2004, 5(5):371-376.

[2] Yde C W, Issinger O G. Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D1[J]. Int J Oncol, 2006, 29(6):1397-1404.

[3] Sullivan A, Lu X. ASPP:a new family of oncogenes and tumour suppressor genes[J]. Br J Cancer, 2007, 96(2):196-200.

[4] Zhang X, Diao S, Rao Q, *et al*. Identification of a novel isoform of iASPP and its interaction with p53[J]. J Mol Biol, 2007, 368(4):1162-1171.

[5] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil N J, *et al*. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet, 2003, 33(2):162-167.

[6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第3版. 北京:科学出版社, 2002:16-56.

[7] Bohnke A, Westphal F, Schmidt A, *et al*. Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells[J]. Int J Radiat Biol, 2004, 80(1):53-63.

[8] Di-Stefano V, Rinaldo C, Sacchi A, *et al*. Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2004, 293(2):311-320.

(编辑 陈聪连)