维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1013-03

Y14 和 Upf1 在人乳腺癌细胞与乳腺细胞中的表达及意义

孔令泉,涂 刚,任国胜

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Y14 和 Upf1 在人乳腺癌细胞株与人乳腺细胞株中的表达及意义。方法:应用 Western blotting、RT-PCR 等方法测定 Y14 和 Upf1 在人乳腺癌细胞株 MCF-7、ZR-75-30、T47D、MDA-MB-435s、MDA-MB-453、MDA-MB-231 与乳腺细胞株 HBL-100 中的表达情况。结果:Y14 和 Upf1 在乳腺癌细胞株与乳腺细胞株中的表达水平有明显差异,6 株乳腺癌细胞中的 Y14 和 Upf1 表达明显高于乳腺细胞株($P<0.05$)。结论:NMD 在乳腺癌细胞株中的作用明显强于乳腺细胞株。

【关键词】NMD;Y14;Upf1;人乳腺癌细胞;人乳腺细胞;Western 印记

【中国图书分类法分类号】R329 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-14

Expression and significance of Y14 and Upf1 in human breast carcinoma cells and breast epithelial cell

KONG Lingquan, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression and significance of Y14 and Upf1 in human breast cancer cells and breast epithelial cell. *Methods*: Western blotting and RT-PCR were applied to detect the expression of Y14 and Upf1 in human breast cancer cells (MCF-7, ZR-75-30, T47D, MDA-MB-435s, MDA-MB-453, MDA-MB-231) and breast epithelial cell (HBL-100). *Results*: Y14 and Upf1 levels of the breast cancer cells were obviously higher than that of breast cell ($P<0.05$). *Conclusion*: NMD activity increased obviously in the breast cancer cells.

【Key words】 NMD; Y14; Upf1; Human breast cancer cells; Breast epithelial cell; Western blotting

无意义密码子介导的 mRNA 降解 (Nonsence-mediated mRNA decay, NMD),是一种细胞内 mRNA 监视机制,是检测和快速降解突变的含无意义密码子的 mRNA[1]。该密码子也称提前终止翻译的密码子 (Premature translation termination codon, PTC)[2]。它作为一种重要而复杂的 mRNA 降解机制广泛存在于人体、哺乳及真核细胞中[3]。由于该途径使含有 PTC 的转录产物 mRNA 被迅速降解,这就阻止了对机体有潜在危害性的蛋白的表达,这正是生物体除去影响细胞功能的错误基因产物,保护自身机体正常运作的一种途径。Y14 和 Upf1 是 NMD 途径的关键因子,Y14 和 Upf1 的存在和量的变化可直接反映 NMD 功能情况[3]。

本实验应用应用 Western blotting 和 RT-PCR 等分子生物学方法测定 Y14 和 Upf1 在人乳腺癌细胞株 MCF-7、ZR-75-30、T47D、MDA-MB-435s、MDA-MB-453、MDA-MB-231 与乳腺细胞株 HBL-100 中的表达情况。从细胞分子层面上探讨 NMD 途径在人乳腺细胞株和人乳腺癌细胞株中的功能上的差异。

作者介绍:孔令泉(1973-),男,主治医师,博士,主要研究方向:乳腺癌。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571822)。

1 材料与方法

1.1 细胞株

实验组细胞:3 株 ER(+)的乳癌细胞:MCF-7、ZR-75-30、T47D,3 株 ER(-)的乳癌细胞株 MDA-MB-435S、MDA-MB-453、MDA-MB-231;对照组为 1 株乳腺上皮细胞株 HBL-100。购于中国科学院上海生物研究所细胞库。

1.2 抗体及试剂

M—PER 细胞裂解液(美国 Pierce 公司),蛋白预染 marker(美国 Fermenta 公司),山羊抗人 Y14 一抗和 β-actin 一抗(美国 Santa Cruz 生化试剂公司),HRP 标记的兔抗山羊

维普资讯 http://www.cqvip.com

IgG、硝酸纤维素膜(北京中山生物技术有限公司),化学发光试剂(美国 Amersham Biosciences 公司),垂直电泳仪(北京六一仪器厂),小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物有限公司)TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 试剂盒、DNA marker(大连 TaKaRa 公司),Golden view 染料(北京天为时代公司)、PCR 引物(Invitrogen 公司)。

1.3 Western blot 检测 Y14 和 Upf1 在细胞株的表达

收获细胞后用 M-PER 蛋白提取剂裂解细胞,提取细胞总蛋白,进行蛋白定量后样品分装,保存于−70℃中。每孔上样 30μg 蛋白,同时加 5μl 蛋白预染 Marker 作为标准参照进行 PAGE 电泳、电转移。电转结束后取出硝酸纤维素膜,观察预染 Marker 的转移效果从而可以判断样品的转移效果,并剪去膜多余的部分,进行免疫杂交检测,采用化学发光法,应用 Syngene Bio Imaging 检测系统观察并照相。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行方差分析或 t 检验。

1.4 RT-PCR 法检测 Y14 和 Upf1 在细胞株的表达

收获细胞后用小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,进行 RNA 纯度测定、浓度检测和 RNA 完整性检测。以 mRNA 为模板,Oligo dT-Adaptor 为引物,经逆转录合成 cDNA,PCR 扩增,1.5%琼脂糖凝胶电泳,运用凝胶成像系统摄像。实验重复 3 次,取平均值,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计检验用方差分析或 t 检验。

2 结 果

2.1 Y14 和 Upf1 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(Western blot 法)

表 1 人乳腺癌细胞株中 14 和 Upf1 Western blot 结果的相对定量分析

Cell lines	Y14(Y14/β-actin)	Upf1(Upf1/β-actin)
MCF-7	0.163 ± 0.014**	0.171 ± 0.016**
ZR-75-30	0.199 ± 0.019*	0.203 ± 0.013*
T47D	0.219 ± 0.020*	0.216 ± 0.019*
MDA-MB-435s	0.222 ± 0.026*	0.231 ± 0.021*
MDA-MB-453	0.239 ± 0.018*	0.242 ± 0.011*
MDA-MB-231	0.299 ± 0.017**	0.301 ± 0.013**
HBL-100	0.101 ± 0.009	0.112 ± 0.011

*、** 同正常细胞相比 $P<0.05$,** 二者相比 $P<0.01$,* 彼此之间相比 $P>0.05$

6 株乳腺癌细胞 Y14 和 Upf1 的 Western blot 结果的相对定量值(Y14/β-actin, Upf1/β-actin)均高于对照组乳腺上皮细胞($P<0.05$,表 1, 图 1,2)。



1.HBL-100 2.MCF-7 3.MDA-MB-231 4.MDA-MB-435s 5.MDA-MB-453 6.ZR-75-30 7.T47D

图 1 Y14 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(Western blot)



1.HBL-100 2.MCF-7 3.MDA-MB-231 4.MDA-MB-435s 5.MDA-MB-453 6.ZR-75-30 7.T47D

图 2 Upf1 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(Western blot)

2.2 Y14 和 Upf1 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(RT-PCR)

表 2 Y14 和 Upf1 RT-PCR 结果的相对定量分析

Cell lines	Y14(Y14/β-actin)	Upf1(Upf1/β-actin)
MCF-7	0.175 ± 0.016**	0.186 ± 0.019**
ZR-75-30	0.221 ± 0.021*	0.225 ± 0.018*
T47D	0.240 ± 0.023*	0.239 ± 0.020*
MDA-MB-435s	0.242 ± 0.029*	0.251 ± 0.021*
MDA-MB-453	0.268 ± 0.021*	0.270 ± 0.011*
MDA-MB-231	0.307 ± 0.027**	0.313 ± 0.021**
HBL-100	0.121 ± 0.009	0.123 ± 0.011

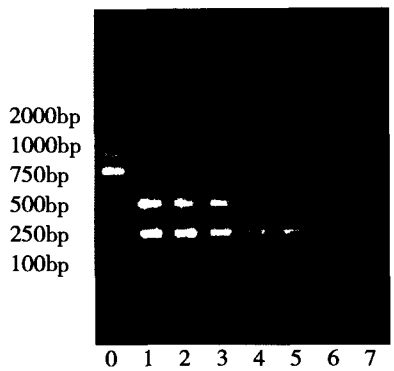
*、** 同正常细胞相比 $P<0.05$, ** 二者相比 $P<0.01$, * 彼此之间相比 $P>0.05$

Y14 和 Upf1 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中都有普遍表达,结果差别有统计学意义),6 株乳腺癌细胞 Y14 和 Upf1 的 RT-PCR 结果的相对定量值(Y14/β-actin, Upf1/β-actin)均高于对照组乳腺上皮细胞的相对定量值($P<0.05$,表 2,图 3,4)。

3 讨 论

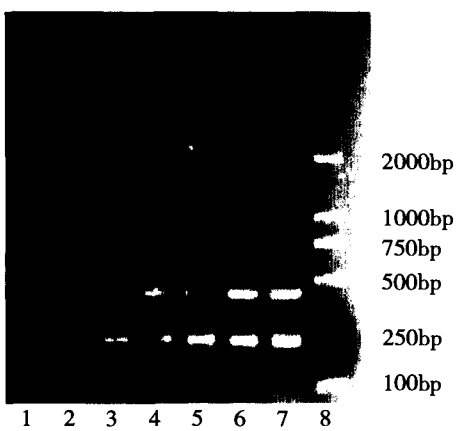
在人体细胞中除含有正常 mRNA 外,还存在由于模板 DNA 突变和转录及加工的固有误差产生的异常 mRNA,例如由于编码氨基酸的密码子突变为提前终止翻译的密码子(Premature translation termination codon, PTC)而使翻译提前终止的无意义

维普资讯 http://www.cqvip.com



0.Marker 1.MDA-MB-231 2.MDA-MB-453 3.MDA-MB-435s 4.T47D 5.ZR-75-30 6.MCF-7 7.HBL-100

图 3 Y14mRNA 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(RT-PCR)



1.HBL-100 2.MCF-7 3. ZR-75-30 4. MDA-MB-435s 5.T47D 6. MDA-MB-453 7. MDA-MB-231 8.Marker

图 4 Upf1 mRNA 在乳腺癌细胞和乳腺细胞中的表达(RT-PCR)

mRNA。研究发现,这些无意义 mRNA 非常不稳定,而且很少翻译成蛋白质,原因在于它们被无意义密码子介导的 mRNA 降解(Nonsence-mediated mRNA decay,NMD)途径降解[1]。NMD 是一种细胞内 mRNA 监视机制,是检测和快速降解突变的含无意义密码子的 mRNA。该密码子也称提前终止翻译的密码子(Premature translationa termination codon,PTC)[2]。它作为一种重要而复杂的 mRNA 降解机制广泛存在于人体、哺乳及真核细胞中[3]。NMD 途径通过对 mRNA 的监视减少了基因表达上的错误,并且监控着大多数能够正确表达基因的转录子。该现象的发现最早源于 1979 年美国学者 Losson R 和 Lacroute F 在对酵母菌 URA 3 基因的研究中观察到无意义密码子突变体在 mRNA 瞬时合成率并非很低的情况下能够降低 mRNA 水平。此后随着分子生物学的进展,NMD 机制在果蝇、蠕虫和哺乳动物细胞中得到证实。1999 年 Matlias W. Hentze 等人在 Cell 杂志上发表了关于"RNA 监视和无意义密码子介导的 mRNA 降解"的文章,开始引起人们对 NMD 机制重视。在引发人类遗传病和癌症等疾病的基因突变中,很多导致 mRNA 翻译提前终止,这些都与 NMD 有着密切的联系[3]。

虽然 NMD 中的很多分子作用机制还不是很清楚,但 NMD 的作用底物和效能已经研究得很多。在 NMD 途径中,有两个重要的功能单位,一个是外显子连接复合体(EJC),一个是由 Upf 蛋白组成的监视复合体。EJC 是由前体 mRNA(pre-mRNAS)中的外显子-外显子连接体上游区的大约 20~24 个核苷酸构成。Y14 和 RNA 结合蛋白 S1 (RNA-binding protein S1,RNPS1) 是 EJC 的两个重要亚单位[4,5]。Y14 蛋白对应到染色体的基因是 14q21-q23, 该基因编码三个转录子。Y14 是一个在细胞内广泛表达的蛋白质。Y14 穿梭在胞浆和胞核内。Y14 是 NMD 所必需的蛋白质,它的作用是补充人类上游移码突变体 (Human up-frameshift mutant,hUpf) 到 EJC 上, 从而触发 NMD。Upf 是 NMD 机制中的反式调控因子,它是 NMD 途径中研究得最多的蛋白质。在真核细胞中,Upf 蛋白作用是发现和降解编码不全的转录子。NMD 途径中它阻止了含 PTC 的 mRNA 翻译成对机体潜在有害的蛋白质。酵母菌中有三种:Upf 蛋白质:Upf1、Upf2、Upf3。在人体中有四种 Upf 蛋白质:hUpf1、hUpf2、hUpf3a 和 hUpf3b。hUpf 3a 促进 NMD 及调节转录的活性较 hUpf3b 弱[6]。研究显示,在 NMD 中,三种 Upf 蛋白质可能相互作用形成一个监视复合体。这个复合体可以监控无意义 mRNA 的稳定性和阻止 PTC-mRNA 的翻译[7]。在酵母菌的三种 Upf 蛋白中,Upf1 是研究得最为清楚的一个因子。在哺乳动物细胞中,也了发现 hUpf1p 具有类似于 Upf1 的功能[8]。表明 Upf 蛋白在高等真核生物细胞中具有高度保守性。由此而知 Y14 和 Upf1 是 NMD 机制的关键因子。Y14 和 Upf1 的存在和量的变化直接反映 NMD 功能情况[3]。

本研究应用 Western blotting 和 RT-PCR 等技术检测了 Y14 和 Upf1 在人乳腺癌细胞和人乳腺细胞中的表达情况, 发现 Y14 和 Upf1 在 6 株人乳腺癌细胞中的表达明显高于人乳腺细胞,说明 NMD机制在人乳腺癌细胞中的作用明显强于人乳腺细胞。

(下转第 1069 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

医疗费用的指导、管理和制约作用。需要注意的是，建立状态空间模型的前提是动态系统符合 Markov 特性，若观察时序不具备该性质，则无法有效地应用此法。

3.2 资料问题与处理

针对原始时序出现的重复现象，作者提出“同期平均值法”与“邻期校正平均值法”处理数据并用于分析。发现模型拟合效果和预测精度与预想的相差不大，故不失为两种可以尝试并改进的数据预处理方法。

3.3 影响乳腺癌患者住院医疗费用的主要因素

住院天数、治疗措施和有无癌转是影响乳腺癌患者住院医疗费用的主要因素。其中，住院天数是影响医疗费用的首要因素。明显地，住院日与住院医疗费用有直接的正比关系，缩短住院日正是控制费用的有效措施，而且大有作为；同时，缩短住院日会提高有效住院天数，还对加强医院的医疗质量管理和在新形式下参与医疗市场竞争有着至关重要的作用。

3.4 管理对策

住院医疗费用的有效降低和合理控制是符合广大人民共同利益的，也是医疗卫生服务领域的大势所趋。随着中国加入 WTO 以及医疗保险制度的逐步出台，在社会统筹资金不很充足的条件下，医院要不断加强自身建设，以提高服务质量和服务水平为目的，以加强医护人员的业务能力和职业道德为手段，最终使医院走上可持续发展的道路，实现经济效益与社会效益的同步增长；医院要切实做到办院理念的转变，切实做到以病人为本，时时处处为病人着想，让病人花最少的钱，得到最优质的医疗服务。各级卫生行政管理部门，应在调查分析的基础上制定单病种的费用标准及相关配套政策，以便更有效地对医院进行引导、管理和规范。

4 有待深入研究与解决的问题

本文仅仅运用时序分析对病种住院医疗费用进行了一个初步的分析与探讨；无论从纵深面，还是从水平面，均有待继续研究。

参 考 文 献

[1] Box G.E.P,Jenkins G.M,Reinsel G.C. Time Series Analysis: Forecasting and Control[M]. 3rd Edition,Prentice-Hall,Inc,1994.

[2] Box G.E.P,Jenkins G.M,Reinsel G.C.时间序列分析、预测与控制顾岚主译[M]. 中国统计出版社,1994.

[3] 王振龙,顾 岚. 时间序列分析[M]. 中国统计出版社,2000.

[4] 方积乾,陆 盈. 现代医学统计学[M]. 第一版,人民卫生出版社,2002.5.

[5] 徐国祥.体制转轨时期宏观经济分析和预测的方法研究[M]. 上海财经大学出版社,1999.2.

(上接第 1015 页)

其原因可能是乳腺癌的多种抑癌基因突变产生了许多含 PTC 的 mRNA，从而加强了 NMD 的降解，使其执行其功能的抑癌蛋白减少，最终导致肿瘤的发生。Y14 和 Upf1 直接反映 NMD 的功能状况。提示 NMD 机制的作用强弱可能与人乳腺细胞的恶性行为、侵袭能力等有关。

参 考 文 献

[1] Weischenfeldt-J,Lykke-Andersen-J,Porse-B. Messenger RNA surveillance:neutralizing natural nonsense[J]. Curr-Biol,2005;15(14):R559-562.

[2] Michael R,Culbertson,Eric Neeno-Eckwall.Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in Saccharomyces cerevisiae[J]. RNA,2005;11:1333-1339.

[3] 冉 亮,任国胜. 无意义密码子介导的 mRNA 降解(NMD)机制的研究进展[J]. 重庆医学,2005;34(12):1895-1897.

[4] Gehring-N-H,Kunz-J-B,Neu-Yilik-G,et al. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements[J]. Mol-Cell,2005;20(1):65-75.

[5] Kashima-I,Yamashita-A,Izumi-N,et al. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay[J]. Genes-Dev,2006;20(3):355-367.

[6] Kunz-J-B,Neu-Yilik-G,Hentze-M-W,et al. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation[J]. RNA,2006;12(6):1015-1022.

[7] Sheila V,GRAHAM. Nonsense-mediated decay breaks the circle [J]? Biochem J,2003;373.

[8] V.Narry Kim,Jeongsik Yong.The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions[J]. EMBO,2001;20:2062-2068.