DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.005
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
386 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0386-04

洛伐他汀对 BRCA1 基因高表达 MCF-7 乳腺癌细胞 p21 的影响

罗远琼,糜漫天,许红霞,韦 娜,张乾勇 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胆固醇合成抑制剂洛伐他汀(LOV)对高表达BRCA1基因MCF-7乳腺癌细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂p21的影响。方法 应用基因转染技术获得BRCA1高表达的MCF-7乳腺癌细胞(MCF-7BRCA1)。8 μmol/L LOV处理细胞1、2、3 d后,通过MTT、Western-blot等方法检测MCF-7及MCF-7BRCA1两种细胞的增殖功能以及周期素依赖性蛋白激酶抑制剂p21表达的改变。结果 LOV处理后,细胞生长减慢,细胞的增殖能力降低,而p21的蛋白表达增加,其中,以BRCA1基因转染的细胞经LOV处理后变化更为显著。结论 BRCA1基因能增强LOV对MCF-7乳腺癌细胞的增殖抑制作用,诱导周期素依赖性蛋白激酶抑制剂p21活性增加,推测这可能是LOV抑制BRCA1基因高表达MCF-7乳腺癌细胞增殖的重要分子机制之一。

关键词:lovastatin;MCF-7细胞;细胞增殖;乳腺癌;p21
中图法分类号:R394-33;R737.9;R972.6 文献标识码:A

Effects of LOV on p21 in BRCA1-overexpressing MCF-7 cells

LUO Yuan-qiong, MI Man-tian, XU Hong-xia, WEI Na, ZHANG Qian-yong (Department of Nutrition Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of synthetic inhibitor of cholesterol lovastatin (LOV) on p21 in BRCA1-overexpressing MCF-7 cells. Methods MCF-7 cells were transfected with BRCA1 gene to establish BRCA1-overexpressing MCF-7 cells (MCF-7BRCA1) by gene transfection technigue. After treatment of MCF-7 cells with 8 μmol/L LOV for 1, 2, and 3 d, the cell proliferation capacity of MCR-7 and MCR-7BRCA1 was observed by MTT, and the protein expression of p21 was determined by Western-blotting. Results After treatment of MCF-7 cells with LOV, the proliferation capacity decreased, but protein expression of p21 was up-regulated. These changes were more significant in BRCA1-transfected cells than the nontransfected cells. Conclusion BRCA1 gene can enhance the inhibitory effect of LOV on the cell proliferation of MCF-7 cells and can induce the up-regulated expression of p21, which might be one of the important molecular mechanisms of the inhibitory effect of LOV on the cell proliferation of BRCA1-overexpressing MCF-7 cells.

Key words: lovastatin; MCF-7 cell; cell proliferation; breast cancer; p21

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率在许多国家和地区居女性恶性肿瘤的首位,严重影响妇女的健康和生命[1],乳腺癌易感基因BRCA1(breast cancer 1)的突变和低表达是诱发乳腺癌的主要原因之一[2]。HMG-CoA还原酶是细胞内胆固醇和异戊二烯生物合成途径的限速酶,其催化产物甲羟戊酸(mevalonate,MVA)是胆固醇、长醇、泛醌、血红素A、异戊烯腺嘌呤、法呢化蛋白质(如p21、Ras和核纤层蛋白)等多种重要产物的前体,它们参与构成细胞膜完整性、糖蛋白合成、电子传递、细胞内信号传导、细胞周期进展等重要的生物学功能[3]。洛伐他汀(lovastatin, LOV)作为羟甲基戊二酸单酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylgutaryl-CoA,HMG-CoA)还原酶强力和高度专一的竞争性抑制剂,能抑制多种肿瘤细胞的增殖、诱导细胞凋亡[4~6]。体外研究表明,LOV能影响细胞周期进程,阻滞HeLa细胞、HL-60细胞、乳腺癌细胞、膀胱癌细胞、前列腺癌细胞于G_0/G_1[7]。我们以前的研究也表明LOV能抑制MCF-7细胞的增殖,阻滞细胞于G_0/G_1期。Seeger[7]等指出LOV能通过降低内源性胆固醇的合成预防和治疗乳腺癌。大量的研究[7,8]显示LOV作用后,细胞周

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271128)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271128)
作者简介:罗远琼(1967-),女,四川省仁寿县人,硕士,助理研究员,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)66673740
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2003-10-08;修回日期:2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

期调控蛋白 cyclins、CDKs 的表达降低, 细胞周期依赖激酶抑制剂 p21 和 p27 水平升高, 与细胞周期 cyclin/CDK 结合增强抑制其活性, 阻止 Rb 蛋白磷酸化, 从而阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期。近年来的研究表明, LOV 能抑制 MCF-7 细胞增殖, 诱导细胞分化, 但作用不十分明显。本研究将 BRCA1 基因的表达载体 pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 导入低浸润性的 MCF-7 乳腺癌细胞株, 使该基因在细胞中稳定高表达, 观察 LOV 对高表达 BRCA1 基因 MCF-7 细胞增殖能力和细胞周期蛋白抑制剂 p21 的影响, 为有效的治疗乳腺癌提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

洛伐他汀(Lovastatin, LOV)德国 Fluka 公司产品, 溶于二甲基亚砜, 配成 3.2×10^4 μmol/L 浓度, 储存于 -20 ℃, 处理细胞终浓度选为 8 μmol/L。含全长人 BRCA1 基因的表达载体 pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 由英国剑桥大学 Ashok Venkitaraman 教授惠赠, MCF-7 细胞购于上海细胞生物研究所, 大肠杆菌(JM109)由本室保存, DMEM 和小牛血清购于 Gibco 公司, p21 单克隆抗体购于北京中山生物技术有限公司, 脂质体转染试剂盒购于 Roche 公司。

1.2　质粒转染

pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 质粒经扩增、酶切鉴定并测试浓度后, 按 DOTAP 脂质体转染试剂盒说明书转染 MCF-7 乳腺癌细胞: 用 10 mmol/L HEPES 缓冲液将 5 μg 质粒 DNA 稀释至 50 μl, 将 30 μl DOTAP 脂质体稀释至 100 μl, 再将他们混合并轻轻摇匀, 室温放置 15 min, 加入 5 ml 完全培养基即成转染培养基。将 50% 汇片的 MCF-7 细胞去掉培养基, 加入含质粒 DNA/脂质体复合物的转染培养基, 混匀, 37 ℃, 5%CO_2, 饱和湿度培养 8 h(每小时振摇 1 次), 换新鲜培养液持续培养 48 h。将细胞以 1∶3 传代, 加 G418 进行筛选(G418 的终浓度为 400 μg/ml), 7 d 左右对照组细胞完全死亡, 10 d 后, 降低 G418 的浓度为 200 μg/ml, 维持筛选 2 周左右, 继续培养阳性细胞克隆, 并使其稳定传代培养。转染有 pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 的 MCF-7 细胞命名为 MCF-7BRCA1。

1.3　免疫细胞化学检测 BRCA1 蛋白表达

按免疫细胞化学试剂盒说明书进行。MCF-7 和 MCF-7BRCA1 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 37 ℃, 体积分数为 5%CO_2 以及饱和湿度下, 常规培养传代。取生长状态良好的细胞经 0.25% 胰酶消化后, 培养在预先放入消毒盖玻片的六孔培养板中, 细胞汇片 60% 后, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min→PBS 浸泡 5 min→3%H_2O_2 甲醇溶液温室处理 5~10 min→PBS 浸泡 5 min→10% 正常山羊血清封闭 10 min→加入 1∶50 稀释的 BRCA1 抗体工作液(阴性对照用 PBS 代替), 37 ℃孵育 1 h 或 4 ℃过夜→PBS, 5 min×3→滴加生物素化二抗工作液, 37 ℃孵育 30 min→PBS, 5 min×3→三抗工作液, 37 ℃孵育 30 min→PBS, 5 min×3→DAB 显色(6 mg DAB, 10 ml TBS, 10 μl 30% H_2O_2) 5~10 min→蒸馏水冲洗, 脱水, 封片, Olympus 荧光显微镜(BX51 型, Olympus)下观察并照相。

1.4　细胞增殖能力的检测

对数生长期的 MCF-7 和 MCF-7BRCA1 细胞以 5×10^4 个/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μl, 加入终浓度为 8 μmol/L LOV, 37 ℃, 体积分数为 5%CO_2 以及饱和湿度下, 培养 24、48、72 h, 收获细胞前 4 h, 每孔加入 15 μl MTT(5 mg/ml), 培养 4 h, 去除培养液, 加入 200 μl 异丙醇、二甲基亚砜混合液(1∶1)。室温 30 min 左右, 用酶联仪测定 D_{492} 值。

1.5　Western blot 分析 p21 蛋白表达

LOV(终浓度为 8 μmol/L)处理对数生长期的 MCF-7 和 MCF-7BRCA1 细胞 1~3 d 后, 冰冷的 PBS 洗涤两遍, 用细胞刮轻轻刮取全部细胞入 1.5 ml 离心管, 加入 100 μl 预冷至 0 ℃的细胞总蛋白裂解液, 冰上放置 30 min, 4 ℃、15 000× g 离心 15 min, 将上清液转移对另一 1.5 ml 离心管中, 并用 lowrry 法测定含量。参照《分子克隆》所述方法, 蛋白提取液经 100 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳分离胶、46.5 g/L 浓缩胶电泳以及电转移装置 100 mA 转膜(PVDF 膜)后, 膜片以 10 g/L BSA 封闭(37 ℃ 1 h, 或 4 ℃过夜), 加 1∶250 稀释的一抗, 37 ℃孵育 1 h, 再先后与生物素酰化的二抗和辣根过氧化酶标记的链酶卵白素反应, 最后用 DAB 显色。

1.6　统计学分析

所有数据结果以 $x\pm s$ 表示, 用 t 检验。

2　结果

2.1　质粒转染鉴定

pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 质粒扩增、酶切鉴定并测试浓度后转染 MCF-7 乳腺癌细胞, 经免疫细胞化学法鉴定结果(图 1、2)显示, pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 质粒转染的 MCF-7 细胞(命名为 MCF-7BRCA1)经 BRCA1 抗体染色后胞核和胞浆有较强的棕色颗粒, 表达明显增强, 而未转染质粒的 MCF-7 细胞内棕色颗粒不明显, 该结果说明此次转染是成功的。



图 1　MCF-7 细胞 BRCA1 免疫细胞化学染色　(DAB 显色×400)

Fig 1　Immunocytochemical staining of BRCA1 in MCF-7 cells
(DAB×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 2 pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 质粒转染 MCF-7 细胞 BRCA1 免疫细胞化学染色 (DAB 显色×400)

Fig 2 Immunocytochemical staining of BRCA1 in MCF-7 cells transfected with pcDNA3-beta- HA-hsBRCA1 plasmid (DAB× 400)

2.2 LOV 对高表达 BRCA1 基因 MCF-7 细胞增殖功能的影响

MTT 比色实验结果显示, 未经 LOV 处理的转染细胞与未转染细胞相比 D_{492} 值无明显差别。LOV 处理 MCF-7 和 MCF-7BRCA1 细胞 1~3 d 后, D_{492}值分别比未经处理的细胞有所下降($P<0.01$), 与 LOV 处理的未转染细胞相比, 转染细胞经 LOV 处理后变化非常显著($P<0.05$)(图 3)。由此可见, LOV 能与 BRCA1 基因协同作用抑制 MCF-7 细胞的增殖。

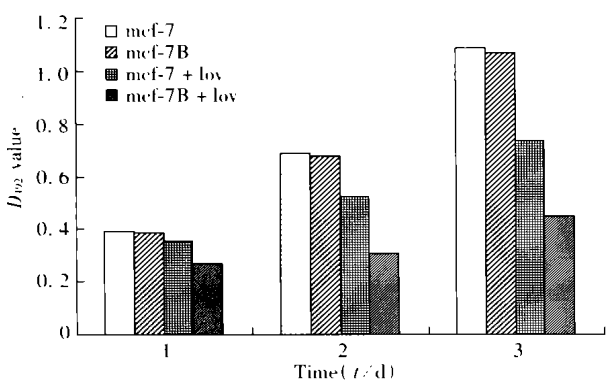


图 3 MTT 法检测 LOV 对高表达 BRCA1 基因 MCF-7 细胞增殖功能的影响

Fig 3 Effects of LOV on the proliferation capacity of cells transfected with or without BRCA1 gene expression vector

2.3 LOV 对 p21 蛋白表达的影响

western-blot 结果显示, 未处理的转染组和未转染组 p21 无明显差异。LOV 处理后, 未转染组 MCF-7 细胞的 p21 表达水平有轻微上调趋势, 而 BRCA1 表达载体转染细胞的 p21 表达水平相对未处理组和未转染处理组上调效果显著。随着作用时间的延长, p21 蛋白表达增加更为明显(图 4)。



1: MCF-7; 2: MCF-7BRCA1; 3: MCF-7 + LOV for 2 d; 4: MCF-7BRCA1 + LOV for 2 d; 5: MCF-7; 6: MCF-7BRCA1; 7: MCF-7 + LOV for 3 d; 8: MCF-7BRCA1 + LOV for 3 d

图 4 Lovastatin 对 MCF-7 细胞 p21 蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of lovastatin on the protein expression of p21 in MCF-7 cells

3 讨论

细胞周期是细胞内通过一系列时空有序的生化事件, 实现生长、分裂、增殖的过程, 该过程取决于细胞周期正负调控因子间的相互作用及平衡, 细胞周期检查点(checkpoint)是保证细胞周期按次序正常运行的调控机制[8], 其中 G_1 期检查点相关基因负向调控途径由野生型 p53 及 WAF1/CIP1 等肿瘤抑制基因组成, 而正向调控途径由 CDKs 和 CylinD, E 等原癌基因组成。野生型 p53 激活片段 1 (wild type p53 activated fragment1, WAF1)或 CDK 相互作用蛋白 1 (CDK interacted protein, CIP1)基因是 wtp53 基因的下游靶基因, 其转录产物 p21 是 CDKI 家族成员之一, 也是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白[9,10]。细胞 G_1 进程依赖于 Cyclin E-CDK2, Cyclin E- CDK4 及 Cyclin D-CDK4 的活性, p21 能与几乎每一个 cyclin-CDK 复合物结合, 形成 p21-cyclin-CDK 三联体, 负性调节 CDK 功能, 使 cyclin-CDK 复合物的激酶活性丧失, 从而阻滞细胞周期于 G_1 期, 抑制细胞的生长[13]。一旦 p21 功能丧失, 无论是由于基因突变或表达的改变, 均可导致在负性生长信号存在时细胞继续增殖, 正常的细胞周期控制能力丧失。肿瘤细胞区别于正常细胞的基本特征是细胞增殖失控和分化受阻[9]。研究表明[11], 细胞周期 G_1 期检查点正负向调控基因的功能失常是肿瘤细胞发生异常增殖的机制之一, 其表达水平的异常可能与癌细胞生物学特性有关。如在乳腺癌中发现, cyclin D1 是瘤基因 neu 和 ras 引起细胞恶性转化的效应子之一, 该基因扩增致使 cyclinD1 蛋白过表达[12]。

乳腺癌易感基因 BRCA1 是一种负生长调节因子[9], 大约一半的遗传性乳腺癌与 BRCA1 基因的突变

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有关[12], BRCA1 能以细胞周期依赖的方式, 从多个水平、多层次上调节细胞周期进程[11], 抑制细胞增殖、生长, 促进细胞分化, 诱导细胞凋亡, 参与 DNA 损伤修复[13~16]。研究表明[17], BRCA1 能从转录水平上调节很多基因的表达, 如 p21(WAF1/CIP1), Gadd45, cyclin B1, DBB2, XPC, 14-3-3σ 等。Timothy 等用腺病毒载体(Ad-BRCA1)转染 H460 和 SW480 两种细胞发现, BRCA1 能诱导 p21 蛋白的表达[18]。体外实验也证明[9], BRCA1 能抑制乳腺癌和卵巢癌细胞的增殖。近年来, 乳腺癌的诊断和以手术为主的综合治疗方法已有不断的改进, 而从细胞、分子生物学水平认识乳腺癌的病因、发病机制和肿瘤发生发展的机制尚不完整[14]。研究乳腺癌细胞生物学特性与细胞周期 G_1 期检查点(check-point)相关基因的改变, 有助于认识乳腺细胞癌变和乳腺癌异质性的机制。本研究用全长人 BRCA1 基因的表达载体 pcDNA3-beta-HA-hsBRCA1 转染低浸润性乳腺癌细胞株 MCF-7, 使其在该细胞中稳定的高表达。经免疫细胞化学染色显示, BRCA1 在 MCF-7 细胞中低表达, 经终浓度 8 μmol/L 的 LOV 处理后, 通过 MTT 检测发现 LOV 能抑制 MCF-7 细胞的增殖, 阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期, 且 BRCA1 基因转染组与对照组和未转染组相比, 其作用更加明显; Western-blot 分析表明, 经 LOV 处理后, 上调周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p21 的表达, 尤其是转染组的变化更显著。该研究说明, LOV 能与 BRCA1 基因协同作用, 增强了 MCF-7 乳腺癌细胞对 LOV 的敏感性和 LOV 对乳腺癌的增殖抑制作用, 上调抑制剂 p21 的活性, 使 p21 与细胞周期调控蛋白 cyclin/CDK 的结合增加, 抑制相关蛋白的磷酸化, 从而抑制细胞周期于 G_0/G_1 期, 这也可能是 LOV 与 BRCA1 协同作用的重要分子机制之一。

参考文献:

[1] Pignatelli M, Cocca C, Santos A, *et al*. Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the MCF-7 breast cancer cell line[J]. Oncogene, 2003, 22(35): 5446—50.

[2] Xiaoman D, Jinghe L. Study of BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer[J]. Chin Med Sci J, 1999, 14(4): 195—199.

[3] 韦　娜, 糜漫天, 张乾勇, 等. 洛伐他汀对 MCF-7 细胞核转录因子和细胞周期调控蛋白表达的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(4): 332—334.

[4] Oda H, Kasiske B L, O'Donnell M P, *et al*. Effects of lovastatin on expression of cell cycle regulatory proteins in vascular smooth muscle cells [J]. Kidney Int Suppl, 1999, 71: S202—205.

[5] Erl W, Hristov M, Neureuter M, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2003, 169(2): 251—258.

[6] Mantha A J, McFee K E, Niknejad N, *et al*. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates lovastatin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 26(2): 350—353.

[7] Seeger H, Wallwiener D, Mueck A O. Statins can inhibit proliferation of human breast cancer cells in vitro[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003, 111(1): 47—48.

[8] Mo H, Elson C E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids[J]. J Nutr, 1999, 129(4): 804—813.

[9] Dupont J, Karas M, LeRoith D. The cyclin dependent kinase inhibitor p21CIP/WAF is a positive regulator of IGF-1-induced cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 15(3): 189—193.

[10] 牛会林, 陶　瑜. 前列腺癌的分子病理学研究进展[J]. 癌症, 2003, 22(5): 552—556.

[11] Ju W, Wang J, Li B, *et al*. An epidemiology and molecular genetic study on breast cancer susceptibility[J]. Chin Med Sci J, 2000, 15(4): 231—237.

[12] Powell S N, Kachnic L A. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation[J]. Oncogene, 2003, 22(37): 5784—5791.

[13] Xiaoman D, Jinghe L. Study of BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer[J]. Chin Med Sci J, 1999, 14(4): 195—199.

[14] Prichard R S, Hill A D, Dijkstra B, *et al*. The prevention of breast cancer[J]. Br J Surg, 2003, 90(7): 772—783.

[15] Yan Y, Haas J P, Kim M, *et al*. BRCA1-induced Apoptosis Involves Inactivation of ERK1/2 Activities[J]. J Biol Chem, 2002, 277(36): 33422—33430.

[16] Hilakivi C L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 4993—5001.

[17] Somasundaram K. Breast cancer gene 1 (BRCA1): Role in cell cycle regulation and DNA repair-perhaps through transcription[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(6): 1084—1091.

[18] MacLachlan T K, Somasundaram K, Sgagias M, *et al*. BRCA1 Effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2777—2785.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net