

· 实验研究 ·

p53 突变型乳腺癌细胞系中 14-3-3 σ 对 p73 基因稳定性的影响

桑梅香 杨瑞玲 周军 周岩 耿翠芝 单保恩

【摘要】 目的 探讨在 p53 突变的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中, 14-3-3 σ 对 p73 基因稳定性的影响。方法 采用基因转染、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹检测(Western blot)和放线菌酮(CHX)蛋白抑制分析的方法研究 14-3-3 σ 对 p73 基因稳定性的影响。结果 RT-PCR 显示, 单独转染 1 μ g p73 后, p73 与 GAPDH 的灰度值比为 0.635; 转染 1 μ g p73 + 1 μ g 14-3-3 σ 和 1 μ g p73 + 2 μ g 14-3-3 σ 后, p73 与 GAPDH 的灰度值比分别为 0.643 和 0.631。Western-blot 显示, 单独转染 1 μ g p73 后, p73 与 actin 的灰度值比为 0.333; 转染 1 μ g p73 + 1 μ g 14-3-3 σ 和 1 μ g p73 + 2 μ g 14-3-3 σ 之后, p73 与 actin 的灰度值比分别为 0.797 和 0.826。放线菌酮蛋白抑制分析显示: 单独转染 p73 的对照组, 放线菌酮处理 0、1、2、4、6 h 后, p73 与 actin 灰度比值分别为 0.075、0.166、0.124、0.100 和 0.092; 而共转染 p73 和 14-3-3 σ 的实验组结果分别为 0.963、0.244、0.244、0.234 和 0.185。结论 在转录水平上, 14-3-3 σ 不影响 p73 基因的稳定性; 而在蛋白表达水平上, 14-3-3 σ 可以增加 p73 基因的稳定性。

【关键词】 P73 稳定性; 14-3-3 σ ; MDA-MB-231 细胞系; 放线菌酮

【中图分类号】 R7373.9

【文献标识码】 A

Effect of 14-3-3 σ on p73 stability in p53-mutant breast cancer cell line SANG Mei-xiang, YANG Rui-ling, ZHOU Jun, ZHOU Yan, GENG Cui-zhi, SHAN Bo-en. Tumor Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 14-3-3 σ on p73 stability in p53-mutant breast cancer MDA-MB-231 cell line. **Methods** In this research, transfection, RT-PCR, Western-blot, protein decay analysis by cycloheximide were used to research the effect of 14-3-3 σ on p73 stability. **Results** RT-PCR showed that the ratio of p73 and GAPDH was 0.635 after transfection of 1 μ g p73; the ratios of p73 and GAPDH were 0.643 and 0.631 after transfection of 1 μ g p73 + 1 μ g 14-3-3 σ and 1 μ g p73 + 2 μ g 14-3-3 σ . Western blot showed that the ratio of p73 and actin was 0.333 after

transfection of 1 μg p73; the ratios of p73 and actin were 0.797 and 0.826 after transfection of 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ and 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ . After transfection of p73 and cycloheximide treatment for 0, 1, 2, 4 and 6 h, the ratios of p73 and actin were 0.075, 0.166, 0.124, 0.100 and 0.092, respectively; While after transfection of p73 and 14-3-3 σ and then cycloheximide treatment for 0, 1, 2, 4 and 6 h, the ratios of p73 and actin were 0.963, 0.244, 0.244, 0.234 and 0.185, respectively.

Conclusion 14-3-3 σ has no effect on p73 stability on transcriptional level; while 14-3-3 σ can increase the stability of p73 on protein level.

【Key words】 P73 stability; 14-3-3 σ ; MDA-MB-231 cell line; Cycloheximide

14-3-3 σ 是 14-3-3 基因家族中唯一能够被 DNA 损伤所诱导的成员。它的活化可以引起细胞周期 G2/M 期阻滞。有研究表明,14-3-3 σ 是人类乳腺上皮的一个特异性标记,其低表达在乳腺癌的发生发展中起重要作用^[1]。p53 基因是 14-3-3 σ 主要的调节基因,另外,p53 家族的其他成员 p63 和 p73 也与 14-3-3 σ 之间存在着一些调节关系。研究已经证实,p73 基因可以正向调节 14-3-3 σ ^[2]。美国 MD Anderson 癌症研究中心在 2003 年研究发现,14-3-3 σ 是 p53 的一个直接的靶基因,并且可以增加 p53 基因的稳定性。本试验的目的旨在用基因转染、RT-PCR、Western blot 和放线菌酮蛋白抑制分析的方法研究 14-3-3 σ 对 p73 基因稳定性的影响,从转录水平和蛋白水平上对两者的相互作用予以确认。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

p53 突变型人类乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 在 DMEM 培养液中培养。培养液含 10% 小牛血清,8% NaHCO₃ 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的青链霉素。培养条件均为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 及 95% 相对湿度。细胞用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 进行消化传代。

1.2 细胞转染

用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine2000 试剂盒^[3],按试剂盒提供的说明书进行转染。转染所用质粒均由日本千叶县癌中心生化学实验室提供。

1.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

MDA-MB-231 细胞接种在 4 个直径为 10 cm 的培养皿中,待细胞覆盖培养皿约 80% 时,按以下设计进行转染:第 1 组转染 3 μg 空载体;第 2 组转染 1 μg p73 + 2 μg 空载体;第 3 组转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ + 1 μg 空载体;第 4 组转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ 。转染 48 h 后,用 Qiagen 公司的 RNeasy mini kit 试剂盒提取细胞总 RNA。用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒,按照说明书进行从 RNA 到 cDNA 的制备。用 Takara 公司的 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增,总反应体系为:模

板 cDNA, 10 × buffer, 2 mmol/L dNTP 各 1 μl, 10 μmol/L 的上下游引物(PCR 引物序列见表 1) 各 0.5 μl, r-Taq 酶 0.1 μl, 无菌双蒸水 6 μl。反应条件为: 95 °C 2 min 预变性, 95 °C 15 s、58 °C 15 s、72 °C 20 s, GAPDH 反应 20 个循环, p73、14-3-3σ 反应 28 个循环, 最后 72 °C 延伸 6 min。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳观察拍照。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物
p73	forward: 5'-TGGAACCAGACAGCCTACTTCG-3'
	reverse: 5'-TGCTGAAAAGTGACCTCAAAGTGG-3'
14-3-3σ	forward: 5'-GAGCGAAACCTGCTCTCAGT-3'
	reverse: 5'-CTCCTTGATGAGGTGGCTGT-3'
GAPDH	forward: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'
	reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

1.4 Western-blot 检测

MDA-MB-231 细胞接种在 4 个直径为 10 cm 的培养皿中, 待细胞覆盖培养皿约 80% 时, 按以下设计进行转染: 第 1 组转染 3 μg 空载体; 第 2 组转染 1 μg p73 + 2 μg 空载体; 第 3 组转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3σ + 1 μg 空载体; 第 4 组转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3σ。转染 48 h 后, 细胞用 1 × PBS 洗涤 2 次, 离心沉淀, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 A (含 pH7.5 的 25 mmol/L Tris-HCl、137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl 和 1% Triton X-100) 冰上放置 30 min, 超声波充分裂解细胞, 20 600 × g 离心 10 min (4 °C), 收集上清液。聚丙烯酰胺凝胶 (SDA-PAGE) 垂直电泳分离, 转移蛋白质到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 一抗 [鼠抗人 p73 单抗 Ab-4 (Neomarkers 公司), 羊抗人 14-3-3σ 多抗 C-18 (Santa Cruz 公司)] 室温孵育 1 h, 膜洗 3 次, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (Cell signaling 公司) 室温孵育 1 h, 膜洗 3 次, 增强化学发光 (ECL, Amersham Biosciences 公司) 显影。

1.5 放线菌酮 (Cycloheximide, CHX) 蛋白抑制分析

MDA-MB-231 细胞接种在 10 个直径为 10 cm 的培养皿中, 待细胞覆盖培养皿约 80% 时, 其中 5 个培养皿 (对照组) 分别转染 1 μg p73 质粒 + 1 μg 空载体, 另外 5 个培养皿 (实验组) 分别转染 1 μg p73 质粒 + 1 μg 14-3-3σ 质粒。转染 24 h 以后, 用终质量浓度为 100 μg/ml 的 CHX 处理细胞, 实验组和对照组都分别处理 0、1、2、4、6 h。然后收集细胞裂解液, 用 Western-blot 检测 p73 蛋白的表达情况。

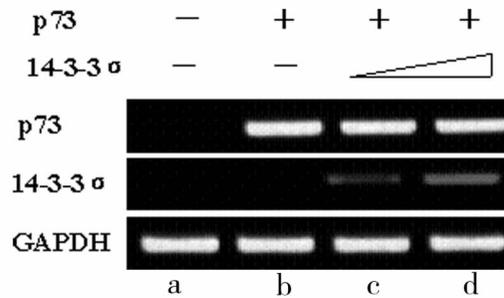
1.6 统计学处理

以上实验均重复 3 次。统计方法运用两样本的 *t* 检验。

2 结果

2.1 14-3-3 σ 在转录水平上对 p73 基因稳定性的影响

采用半定量 PCR 分析转染不同量的 14-3-3 σ 之后, p73 基因在转录水平上的表达。在阴性对照组, 没有检测到 p73 基因的表达; 单独转染 1 μg p73 之后, p73 条带与 GAPDH 条带的灰度值比为 0.635 ± 0.020 ; 转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ 之后, p73 条带与 GAPDH 条带的灰度值比为 0.643 ± 0.019 ; 转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ 之后, p73 条带与 GAPDH 条带的灰度值比为 0.631 ± 0.017 。各组比值之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1), 表明在转录水平上, 14-3-3 σ 不影响 p73 基因的表达。

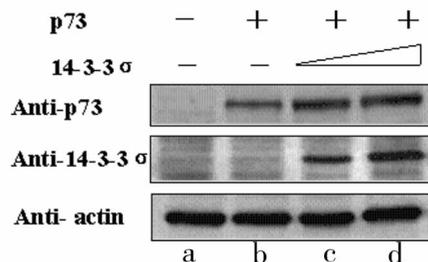


a: 阴性对照组, 转染 3 μg 空载体; b: 转染 1 μg p73 + 2 μg 空载体; c: 转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ + 1 μg 空载体; d: 转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ

图 1 14-3-3 σ 在转录水平上对 p73 基因稳定性的影响

2.2 14-3-3 σ 在翻译水平上对 p73 基因稳定性的影响

用 Western-blot 分析转染不同量的 14-3-3 σ 之后, p73 基因在翻译水平上的表达。在阴性对照组, 没有检测到 p73 基因的表达; 单独转染 1 μg p73 之后, p73 条带与 actin 条带的灰度值比为 0.333 ± 0.012 ; 转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ 之后, p73 条带与 actin 条带的灰度值比为 0.797 ± 0.021 ; 转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ 之后, p73 条带与 actin 条带的灰度值比为 0.826 ± 0.022 。各组比值之间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2), 表明在翻译水平上, 14-3-3 σ 增加了 p73 基因表达的稳定性, 并且 p73 基因的稳定性和 14-3-3 σ 之间有一个浓度依赖关系。



a: 阴性对照组, 转染 3 μg 空载体; b: 转染 1 μg p73 + 2 μg 空载体; c: 转染 1 μg p73 + 1 μg 14-3-3 σ + 1 μg 空载体; d: 转染 1 μg p73 + 2 μg 14-3-3 σ

图 2 14-3-3 σ 在翻译水平上对 p73 基因稳定性的影响

2.3 放线菌酮蛋白抑制分析结果

转染 1 μg p73 质粒 + 1 μg 空载体的对照组,经放线菌酮处理 0、1、2、4、6 h 后,Western-blot 检测的 p73 蛋白与 actin 蛋白灰度比值分别为 0.075 ± 0.005、0.166 ± 0.004、0.124 ± 0.005、0.100 ± 0.007、0.092 ± 0.004;而转染 1 μg p73 质粒 + 1 μg 14-3-3σ 质粒的实验组得出的结果则分别为 0.963 ± 0.005、0.244 ± 0.005、0.244 ± 0.005、0.234 ± 0.004、0.185 ± 0.004。两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 3,表 2),表明 14-3-3σ 在蛋白水平上稳定了 p73 基因的表达。

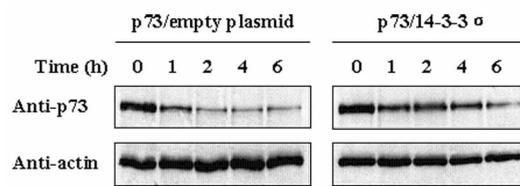


图 3 放线菌酮蛋白抑制分析

表 2 放线菌酮蛋白抑制分析中,对照组和实验组 p73 与 actin 蛋白灰度值的比值

Time/h	p73	p73 + 14-3-3σ	t 值	P 值
0	0.775 ± 0.005	0.963 ± 0.005	46.08	$P < 0.01$
1	0.166 ± 0.004	0.244 ± 0.005	21.10	$P < 0.01$
2	0.124 ± 0.005	0.244 ± 0.005	29.41	$P < 0.01$
4	0.100 ± 0.007	0.234 ± 0.004	9.12	$P < 0.01$
6	0.092 ± 0.004	0.185 ± 0.004	9.03	$P < 0.01$

3 讨论

作为细胞周期负调控因子,14-3-3σ 在细胞周期中的作用与 p21^{WAF1} 基因的作用相似,它的活化可以引起细胞周期 G2/M 期阻滞,从而发挥其抑癌基因的作用^[4]。Prasad 等^[5]研究发现,14-3-3σ 在人类乳腺肿瘤细胞中的表达呈下调趋势,可以作为人类乳腺上皮的一个特异性标记。Vercoutter Edouart 等^[6]也发现,和人类乳腺正常组织相比,14-3-3σ 在乳腺癌组织中的表达显著降低。Ferguson 等^[7]也发现,在大多数的乳腺癌中 14-3-3σ 超低表达。以上研究提示,14-3-3σ 可以作为一个抑癌基因在乳腺癌的发生、发展中起重要作用,14-3-3σ 抑癌作用的消失可能是乳腺癌发生的一个重要原因。因此研究 14-3-3σ 在基因水平上的调节,对乳腺癌发生、发展及预后的研究可能会起到新的突破。

p53 基因是 14-3-3σ 主要的调节基因。另外一些研究表明,p53 家族的其他成员 p63、p73 也与 14-3-3σ 之间存在着一些调节关系^[8]。Yang 等^[9]的研究表明,14-3-3σ 是 p53 的一个直接的靶基因,并且可以增加 p53 基因的稳定性。

2006年,本研究所报道了 p53 基因家族成员 p73 基因对 14-3-3 σ 的靶向性的调节作用^[2],并且推测 14-3-3 σ 有可能对 p73 基因的稳定性产生一定的影响。基于此目的,我们采用了基因转染、RT-PCR、Western blot 和放线菌酮蛋白抑制分析的方法研究了 14-3-3 σ 对 p73 基因稳定性的影响。RT-PCR 结果证实,在转录水平上,14-3-3 σ 不影响 p73 基因的表达。Western blot 结果表明,在翻译水平上,14-3-3 σ 增加了 p73 基因表达的稳定性,并且 p73 基因的稳定性和 14-3-3 σ 之间有浓度依赖关系。

放线菌酮是一种蛋白分子合成抑制剂^[10]。本研究用放线菌酮处理细胞以抑制 p73 蛋白的合成。实验结果显示,单独转染 p73 的一组细胞在每个时间点的蛋白合成受到明显的抑制,而共转染 p73 和 14-3-3 σ 的一组细胞的蛋白合成抑制率明显降低。这进一步证实了 14-3-3 σ 在蛋白水平上增加 p73 基因的稳定性。至于 14-3-3 σ 为何不影响 p73 基因的转录稳定性,而只在蛋白水平上稳定 p73 基因的表达,还需进一步的研究来证实。

参考文献

- [1] Horie Inoue K, Inoue S. Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3 σ in breast and prostate cancers. *Cancer Biol*, 2006, 16:235 - 239.
- [2] Sang M, Li Y, Ozaki T, *et al.* P73-dependent induction of 14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347:327 - 333.
- [3] 张森,邵康,张翠艳,等. 3p21·3 区域肺癌相关基因 RASSF1A 的抑癌功能研究. *中华医学杂志*, 2005, 85:48-51.
- [4] Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1997, 1: 3 - 11.
- [5] Prasad G L, Valverius E M, McDuffie E, *et al.* Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth Differ*, 1992, 3: 507 - 513.
- [6] Vercoutter Edouard A S, Lemoine J, LeBourhis X, *et al.* Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001, 61: 76 - 80.
- [7] Ferguson A T, Evron E, Umbricht C B, *et al.* High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 6049 - 6054.
- [8] Mhawech P. 14-3-3 proteins - an update. *Cell Res*, 2005, 15: 228 - 236.
- [9] Yang H Y, Wen Y Y, Chen C H, *et al.* 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 7096 - 7107.
- [10] 陈学清,潘国宗,周殿元. 放线菌酮对大鼠应激性溃疡的预防作用. *中华医学杂志*, 1998, (6):40 - 41.

(收稿日期:2007-05-08)

(本文编辑:陈莉)