

增加 UHRF1 的表达降低乳癌细胞的放射敏感性

李新莉¹ 樊赛军^{1,2}

¹ (苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

² (美国华盛顿特区乔治敦大学 Lombardi 肿瘤研究中心)

摘要 为了了解基因 UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) 基因对乳癌细胞的生长、增殖和放射敏感性的影响, 将全长 UHRF1 基因的 cDNA 克隆至真核表达载体 pcDNA3 中, 通过脂质体介导转染入乳癌细胞 MDA-MB-231, 筛选出 UHRF1 高表达的细胞株。借助生长曲线、集落形成实验, 研究基因转染细胞的生长、增殖能力; 通过 γ 射线辐照后的集落形成实验, 观察基因转染对细胞放射敏感性的影响。实验结果显示, 与 MDA-MB-231 母细胞和转染了 pcDNA3 “空” 质粒的 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞相比, 转染有 UHRF1 基因的 MDA-MB-231/UHRF1 细胞的生长率和克隆形成率都未有明显改变, 但细胞的放射敏感性明显降低, 这些结果首次揭示人类 UHRF1 基因的表达水平并不影响乳癌细胞 MDA-MB-231 的生长和增殖能力, 但可以调节其放射敏感性, 具体机制有待进一步深入研究。

关键词 人类 UHRF1 基因, 乳癌, 稳定转染, 细胞生长, 放射敏感性

中图分类号 R811.5, Q344+.14

UHRF1 基因是近年发现的一个新基因。人 UHRF1 基因和鼠 UHRF1 基因的氨基酸序列有 73.7% 的同源性^[1,2]。目前的研究已表明, 鼠 UHRF1 基因具有调节细胞周期进程、细胞增殖以及影响细胞放射敏感性等作用^[3-10], 而人 UHRF1 基因的生物学功能目前还有待实验探索 and 了解。在这项研究中, 采用人 UHRF1 基因稳定转染技术, 增加人类乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 UHRF1 的表达水平, 以观察 UHRF1 对细胞的生长、增殖和放射敏感性的影响。

1 材料

1.1 主要材料

人类乳癌细胞系 MDA-MB-231, 购自美国细胞收藏中心 (American type culture collection, ATCC), 由本实验室培养和保藏。D-MEM、新生小牛血清购自美国 Gibco 公司; 脂质体、逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Go Taq Green Master Mix PCR 扩增试剂盒, 购自美国 Promega 公司; 抗 UHRF1 抗血清, 由本实验室自行免疫兔子获得。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 γ 线照射 人类乳癌 MDA-MB-

231 细胞采用含 10% 小牛血清的 D-MEM 常规培养。细胞保持在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱内。正常情况下细胞贴壁生长, 每 2d 换 1 次细胞培养液, 每 3~4d 进行 1 次细胞传代。细胞照射采用 ¹³⁷Cs γ 线照射源 (JL Shepherd Mark I 照射机), 照射剂量为 0、1、2、4、6 和 8Gy, 照射剂量率为 3.5Gy/min。

1.2.2 pcDNA3/UHRF1 重组体转染和克隆筛选 全长人类 UHRF1 基因的 cDNA 定向地克隆到真核细胞表达载体 pcDNA3 中, 并采用限制性内切酶酶切分析和 DNA 序列分析鉴定构建好的重组质粒。采用脂质体 Lipofectamine2000 介导的转染方法, 将构建好的 pcDNA3/UHRF1 表达载体或 “空” pcDNA3 表达载体 (作为阴性对照), 导入 MDA-MB-231 细胞中, 并在含有 500 μ g/mL G418 的培养液进一步培养和筛选, 大约 2~3 周后, 可见典型的抗 G418 的克隆形成, 克隆细胞进一步生长和扩展, 最后采用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测 UHRF1 基因 mRNA 和蛋白的表达情况。所有克隆细胞都保持在含有 G418 的培养液中传代培养。所有实验则以不含 G418 的培养液的细胞进行, 以避免 G418 对实验结果的影响。

1.2.3 RT-PCR 法 采用 RT-PCR 方法检测细胞中 UHRF1 mRNA 的表达水平。根据 GeneBank 中

国家自然科学基金面上项目 (30672435)、苏州大学医学发展基金 (EE126713)、国家级中小企业科技创新基金 (06C26223201098)、江苏省 “六大人才高峰” 第三批项目 (06-C-004) 资助

第一作者: 李新莉, 女, 1976 年 6 月出生, 2002 年 6 月获苏州大学硕士学位, 在读博士研究生, 讲师, 放射医学专业
通讯联系人: 樊赛军

收稿日期: 初稿 2008-03-27, 修回 2008-04-25

UHRF1 (ABQ59043) 的基因序列, 采用引物设计软件 primer premier5 设计引物。UHRF1 两条引物的序列为:

5'TCC CTG AAT TCA GCG CCG ACA CCA TGT GGA TCC'3;

5'TGA TCT CGA GAC TGT TCC GCG GTC CTC TTG TTG CC'3;

扩增产物长度为 2,300bp。

同时测定 GAPDH 的表达作为实验内参对照, 其两条引物的序列为:

5'-GAA TTC ATT TTT GAG ACC TTC AA -3'

5'-CCG GAT CCA TCT CTT GCT CGA AGT CCA -3';

扩增产物长度 326bp。

收集指数生长细胞, 并按 Trizol 试剂盒说明书提取总的 RNA。取 5 μ g RNA 提取物, 用于逆转录反应, 以逆转录的 cDNA 为模板, 采用 25 μ L 的反应体系, 采用 PCR 反应试剂盒进行 PCR 反应。

反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 灭活及预变性 3min; 再经 94 $^{\circ}$ C 60s, 56 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 反应 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取反应产物 10 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 40min, 紫外灯下观察、照相。

1.2.4 Western 蛋白免疫印迹法 含量 100 μ g 总蛋白采用 10% SDS、PAGE 分离, 将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉进行非特异封闭, PBS 冲洗后, 加入抗 UHRF1 抗血清 (本实验室自己制备), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 0.1% Tween PBS 冲洗, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 冲洗后加入化学发光剂 (Amersham 公司) 进行曝光。在同一张膜上也测定了 actin 蛋白的表达水平 (C-19, 美国 Santa Cruz 生物技术公司) 作为样品内参对照。

1.2.5 细胞生长测定 将未转染的 MDA-MD-231 母细胞、转染了“空”pcDNA3 质粒和 pcDNA3/UHRF1 的细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞计数后制成 8×10^4 细胞悬液, 接种于 6 孔培养板, 每组设 3 个复孔, 细胞连续培养 8d, 每天进行细胞计数, 最终绘制生长曲线。

1.2.6 集落形成法 将 MDA-MB-231/UHRF1 细胞、MDA-MB-231/pcDNA3 细胞和 MDA-MB-231 母细胞以合适的密度接种到 60mm 的培养皿中, 每实验组采用 3 个平行样。然后连续培养细胞 15d, 其中更换培养液 4 次。实验结束时 PBS 小心轻洗两遍, 采用 Gimsa 染色, 最后在显微镜下计数集落中细胞数大于 50 的细胞克隆, 并计算克隆形成率 (克隆形成率 = 生成的克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$) 和存活分

数 (存活分数 = 某一剂量照射后形成的克隆数/接种的细胞数/接种效率)。

1.2.7 统计学分析 所有数据分析, 采用 SPSS10.0 统计软件的 *t* 检验, *p* 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UHRF1 稳定转染细胞的建立和筛选

为了解人类 UHRF1 基因对肿瘤细胞的生物学影响, 首先利用脂质体方法, 将基因重组的方法构建好的 UHRF1 真核表达质粒 pcDNA3/UHRF1 转入人类乳癌 MDA-MB-231 细胞, “空” pcDNA3 质粒也同步转染作为阴性对照, 转染质粒后的细胞在含有 500 μ g/mL G418 的培养液继续培养, 大约 3 周, 获得抗 G418 的稳定表达细胞克隆。收集克隆后, 分别采用 RT-PCR 和 Western Blot 法测定 UHRF1 的 mRNA (见图 1) 和蛋白 (见图 2) 表达。

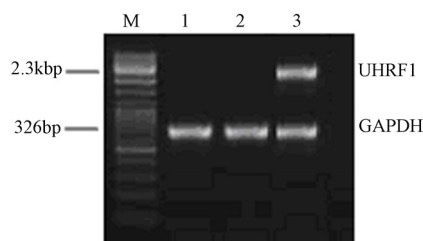


Fig.1 Identification of the plasmid pcDNA3/UHRF1 transfection MDA-MB-231 cell by use of RT-PCR
M. DL2000 molecular mass marker; 1. Cell of MDA-MB-231; 2. Cell of MDA-MB-231/pcDNA3; 3. Cell of MDA-MB-231/UHRF1

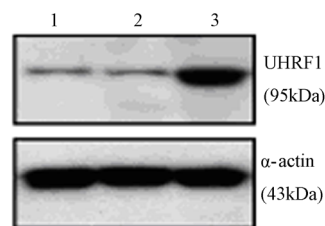


Fig.2 Western Blot analysis of UHRF1
1. MDA-MB-231; 2. MDA-MB-231/pcDNA3; 3. MDA-MB-231/UHRF1

正如图 1 所示, UHRF1 的 mRNA 表达水平, 在未转染的 MDA-MB-231 细胞以及转染有“空”质粒 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞中均不能检测到, 但在转染有 UHRF1 基因的 MDA-MD-231/UHRF1 细胞中, UHRF1 的 mRNA 的表达明显增加, 即可以通过 RT-PCR 扩增出大约 2.3kbp 的片段。

采用 Western 蛋白免疫印迹法测定发现, UHRF1 蛋白表达水平在 MDA-MB-231/UHRF1 细胞中也显现明显增加, 而在 MDA-MB-231 母细胞和 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞中 UHRF1 的蛋白表

达水平非常低,但可以测到(见图2)。这些测定结果表明 UHRF1 重组质粒的构建和 UHRF1 基因稳定转染株的建立都是成功的。

2.2 UHRF1 高表达不影响 MDA-MB-231 细胞的生长

在筛选抗 G418 的稳定转染细胞克隆时发现,MDA-MB-231 母细胞,MDA-MB-231/pcDNA3 对照细胞和 MDA-MB-231/UHRF1 的转染细胞之间,形成的抗 G418 细胞克隆大小和数量上并未见有明显的差异,表明 UHRF1 高表达并不影响细胞的生长和分裂。在得到了抗 G418 的稳定转染细胞后,采用细胞计数方法进一步比较了 MDA-MB-231 母细胞,MDA-MB-231/pcDNA3 对照细胞和 MDA-MB-231/UHRF1 细胞的生长情况,发现这些细胞的生长率之间并没有显示明显的差异(见图3)。细胞的倍增时间分别为:MDA-MB-231/UHRF1 细胞为 23h,MDA-MB-231/pcDNA3 细胞为 23.5h,MDA-MB-231 母细胞为 23.5h ($p > 0.05$)。

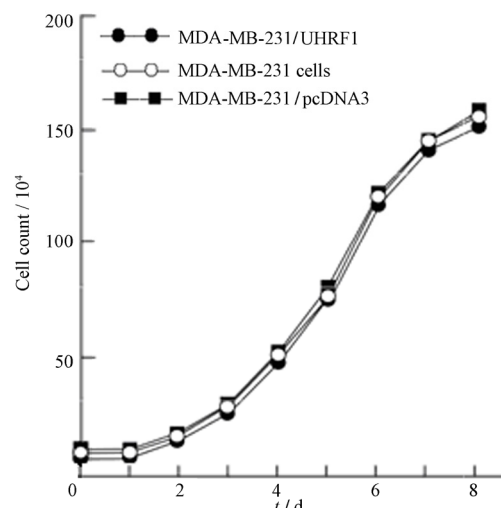


Fig.3 Growth curve of MDA-MB-231/UHRF1, MDA-MB-231/pcDNA3 and MDA-MB-231 cells

比较了上述三组细胞之间的细胞集落形成率,同样未发现细胞生长、细胞集落形成率之间的明显差异(见表1)。研究结果表明,通过稳定转染所产生的 UHRF1 高表达,并不影响细胞的分裂和增殖。

Table 1 Colony forming of MDA-MB-231 cells transfected by pcDNA3/UHRF1

Cell	Plating number	Number of colony	Plating efficiency / %
MDA-MB-231	600	178	29.7
MDA-MB-231/pcDNA3	600	183	30.5
MDA-MB-231/UHRF1	600	185	30.9

2.3 UHRF1 高表达降低 MDA-MB-231 细胞的放射敏感性

以前的研究表明,提高鼠 UHRF1 的表达可以影响细胞对电离辐射的敏感性^[2],我们将 MDA-MB-231 细胞、MDA-MB-231/pcDNA3 细胞和

MDA-MB-231/UHRF1 细胞,分别给予不同剂量的 γ 射线照射,于照射后 24h,将细胞消化,以合适的密度接种培养,15d 后观察细胞的集落形成情况,计算克隆的接种效率和存活分数,比较细胞放射敏感性的差异(见表2~表4和图4)。

Table 2 Plating number of cells receiving different absorbed doses

Dose / Gy	0	1	2	4	6	8
MDA-MB-231	600	600	1000	1000	2000	20000
MDA-MB-231/pcDNA3	600	600	1000	1000	2000	20000
MDA-MB-231/UHRF1	600	600	1000	1000	2000	10000

Table 3 Colony number of cells receiving different absorbed doses

Dose / Gy	0	1	2	4	6	8
MDA-MB-231	178	160	232	128	95	172
MDA-MB-231/pcDNA3	183	163	229	134	110	189
MDA-MB-231/UHRF1	185	182	294	263	278	275

Table 4 Surviving fraction of cells receiving different absorbed doses

Dose / Gy	0	1	2	4	6	8
MDA-MB-231	1	0.9	0.78	0.43	0.16	0.03
MDA-MB-231/pcDNA3	1	0.89	0.75	0.44	0.18	0.03
MDA-MB-231/pcDNA3/UHRF1	1	0.98	0.95	0.85	0.45	0.09

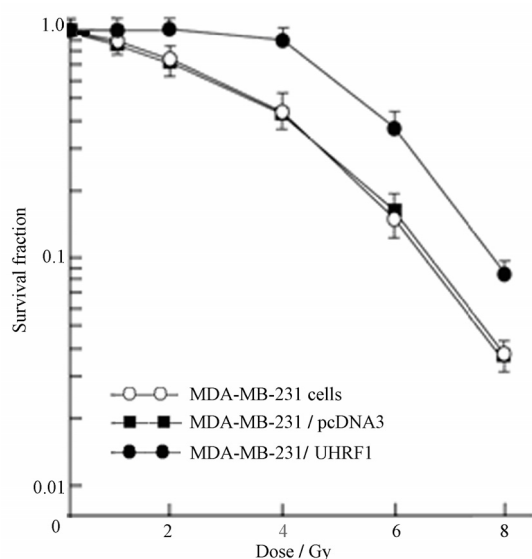


Fig.4 Colony forming of MDA-MB-231/UHRF1, MDA-MB-231/pcDNA3 and MDA-MB-231 cells receiving different absorbed doses

正如图 4 所示, MDA-MB-231 母细胞和 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞之间的放射敏感性并无差异, D_0 值, 即细胞的平均致死剂量, 大约都为 2.08Gy ($p>0.05$)。这就是说转染“空”pcDNA3 质粒不造成 MDA-MB-231 细胞放射敏感性的改变。然而, MDA-MB-231/UHRF1 细胞的放射敏感性则明显降低, D_0 值为 3.17Gy, 与 MDA-MB-231 母细胞和 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞的 D_0 值相比, 有着统计学意义 ($p<0.05$)。这些实验数据表明 UHRF1 高表达可以显著降低 MDA-MB-231 细胞对辐射的敏感性。

3 讨论

UHRF1 是首先被克隆作为一种与细胞生长有关的核蛋白基因^[11], 而后发现其可能与细胞周期调控有关^[3-5,12]。人 UHRF1 基因(基因库号 ABQ59043)位于人类染色体 19p13.3, 含有 18 外显子, 一 2.4 kb 大小的 cDNA。人 UHRF1 蛋白含有 793 氨基酸并包括一个类泛素 (Ubiquitin-like) 模式, 一个亮氨酸拉链模式 (Leucine zipper motif), 锌指模式 (Zinc finger motif), 一个 cyclinA/E-CDK2 磷酸位点, 一个 RB 结合部位和一个指状构造^[1]。而鼠 mUHRF1 则含有 17 外显子, 2.7-kb cDNA, 鼠 UHRF1 蛋白序列与人 UHRF1 蛋白序列间有着 73.7% 的同源性^[1,2]。人 UHRF1 基因生物学功能目前还不清楚, 为此获得该基因高表达的稳定转染克隆, 是进行功能研究的工具, 而基因转染后, 对细胞的生长、增殖以及其它的生物学特性, 是否会产生影响? 就此我们完成了本实验研究。

正像 RT-PCR 以及 Western 蛋白免疫印迹法证实 (见图 1 和 2), 通过全长的人 UHRF1 cDNA 的稳定转染能在人类乳癌 MDA-MB-231 细胞中明显地提高 UHRF1 mRNA 和蛋白的表达水平。在 MDA-MB-231 细胞中 UHRF1 mRNA 和蛋白的表达存在差异, 没有测到 UHRF1 mRNA 的存在, 而可以测到其蛋白的水平, 这种 UHRF1mRNA 和蛋白表达上的差异可能是由于 RT-PCR 循环数不够造成的, 进一步的实验正在本实验室进行, 以了解 UHRF1 mRNA 和蛋白水平上的差异。另外, Western

蛋白免疫印迹的电泳图中, 可以在 MDA-MB-231 细胞及转染 pcDNA3 的细胞 MDA-MB-231/pcDNA3 中, 检测到 UHRF1 的表达, 说明 UHRF1 在细胞中是可以表达的, 那么, 这种表达是否参与细胞中某些生物学过程的调节? 还是发挥某种功能调节, 还有待深入研究。

在建立 UHRF1 高表达稳定转染细胞过程中发现, 抗 G418 的 MDA-MB-231/pcDNA3 与 MDA-MB-231/UHRF1 之间, 单个细胞的数量和集落大小并无明显差异, 这说明增加 UHRF1 的表达并不影响 MDA-MB-231 细胞的生长。为了进一步了解 UHRF1 对细胞的生长所产生的影响, 在获得这些稳定转染细胞株后, 也测定了不同稳定转染细胞和 MDA-MB-231 母细胞的生长倍增时间及细胞集落形成。结果显示: 与 MDA-MB-231 母细胞及转染“空”pcDNA3 的 MDA-MB-231/pcDNA3 细胞相比, MDA-MB-231/UHRF1 细胞的倍增时间仅稍微短了点, 但无统计学上的差异 ($p>0.05$)。另外, 本文也测定了转染细胞对血清, 即生长因子的依赖性, 结果发现, 减少培养液中的血清浓度, MDA-MB-231/pcDNA3 细胞的反应性与 MDA-MB-231/UHRF1 是一致的, 两组细胞之间未见异常 (数据未显示), 这些结果都表明 UHRF1 基因转染并未影响细胞的增殖能力, 结合以前有报道 UHRF1 可以影响正常细胞的生长和我们有关乳癌细胞的实验结果, 说明 UHRF1 对细胞生长的影响可能具有细胞类型依赖性。有关 UHRF1 对不同细胞的生长影响实验正在我们实验室进行中。

以前有实验发现, 转染了鼠 UHRF1 基因的细胞放射敏感性有所改变^[2], 因此, 我们采用这些 UHRF1 高表达的稳定转染细胞, 研究了人 UHRF1 对乳癌细胞的放射敏感性的影响。正如图 4 所示, 提高人 UHRF1 表达可以降低乳癌细胞的放射敏感性, 尽管放射敏感性的调节机制还需要进一步地深入研究, 但这些实验研究首次表明人类 UHRF1 是一放射敏感性相关的新基因。

我们相信这些新的研究结果将为临床把 UHRF1 作为提高乳癌放射治疗疗效的靶基因提供了重要的实验数据和依据。目前本实验室正采用裸鼠模型进行动物实验, 以了解 UHRF1 高表达对动物肿瘤的生长和放射敏感性影响, 同时采用 cDNA

基因芯片方法, 了解 UHRF1 对放射敏感性影响的作用机制。

4 结论

通过上述的实验结果表明: 人类 UHRF1 基因的表达水平并不对乳癌细胞 MDA-MB-231 的生长和增殖能力产生任何影响, 但可以调节细胞对辐射的敏感性。这些实验结果提示, 乳癌细胞中 UHRF1 基因的表达水平, 在临床上可能影响乳癌病人的放射治疗效果。

本实验结果表明, UHRF1 的高表达可以降低细胞的辐射敏感性, 那么, 如果采用 RNA 干扰技术, 降低乳癌细胞中 UHRF1 的表达水平, 理论上应该可以增强乳癌细胞的辐射敏感性, 更好地提高放射治疗效果。

参考文献

- 1 Muto M, Kanari Y, Kubo E, *et al.* J Biol Chem, 2002, **277**(37): 34549-34555
- 2 Muto M, Fujimori A, Neno M, *et al.* Radiat Res, 2006, **166**(5): 723-733
- 3 Ian Marc Bonapace, Lucia Latella, Roberto Papait, *et al.* J Cell Biol, 2002, **157**(6): 909-914
- 4 Masahiko M, Hiroshi W, Takehito S, *et al.* Experimental Cell Research, 2001, **263**(2): 202-208
- 5 Uemura T, Kubo E, Kanari Y, *et al.* Cell Struct Funct, 2000, **25**(3): 149-159
- 6 Arima Y, Hirota T, Bronner C, *et al.* Genes Cells, 2004, **9**(2): 131-142
- 7 Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, *et al.* Mol Biol Cell, 2005, **16**(12): 5621-5629
- 8 Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y. Oncogene, 2004, **23**(46): 7601-7610
- 9 Hopfner R, Mousl M, Oudet P, *et al.* Anticancer Res, 2002, **22**(6A): 3165-3170
- 10 Muto M, Kanari Y, Kubo E, *et al.* J Biol Chem, 2002, **277**(37): 34549-34555
- 11 Fujimori A, Matsuda Y, Takemoto Y, *et al.* Mamm Genome, 1998, **9**(12): 1032-1035
- 12 Mori T, Li Y, Hata H, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2002, **296**(3): 530-536

Increased expression of UHRF1 reduces radiosensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cells

LI Xinli¹ FAN Saijun^{1,2}

¹ (School of Radiation Medicine and Public Health, Medical College of Soochow University Suzhou 215123, China)

² (Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington DC)

ABSTRACT In order to study the effect of UHRF1 on growth and radiosensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cells, The stable clones of MAD-MB-231 cells with UHRF1 gene overexpression were established by transfection of a full-length human UHRF1 cDNA which was cloned into a mammalian expression vector pcDNA3. And the effect of UHRF1 on growth of MDA-MB-231 cells was identified by population double time and colony formation assays. The change of radiosensitivity after γ -irradiation was determined by colony formation assay. It has been found that enhanced expression of UHRF1 does not affect cell growth and colony formation. However, in comparison with MAD-MB-231 parental cells and MAD-MB-231/pcDNA3 cells, MAD-MB-231/UHRF1 cells are less susceptibility to γ -irradiation. These results indicate, for the first time, that human UHRF1 may be an important mediator in radiotherapy of breast cancer, although further study is still needed.

KEYWORDS Human UHRF1 gene, Breast cancer, Stable transfection, Cell growth, Radiation sensitivity

CLC R811.5, Q344+.14