

乳腺癌细胞系 HCC1937 和 MCF7 在 DNA 损伤修复反应时功能的比较

董超 张凤梅 赵锡鹏 郭公社 罗月 凤志慧

【摘要】 目的 通过比较 DNA 损伤修复基因乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 和抑癌基因 p53 在 HCC1937 和 MCF7 两种乳腺癌细胞系中的功能状态及对 DNA 损伤修复反应的应答特性, 研究两种细胞系在功能上的差异。方法 应用 western-blotting 法检测两种乳腺癌细胞系中 BRCA1 和 p53 蛋白的表达, 并检测了经过 10 Gy 电离辐射下 1、4、8 h 后 BRCA1 蛋白在 MCF7、HCC1937 和 HCC1937 野生型 BRCA1 (HCC1937 wtBRCA1) 细胞系中的表达水平。同时用免疫荧光法观察 BRCA1 蛋白在 MCF7 和 HCC1937 细胞系细胞内的分布和焦点形成情况, 并对电离辐射下的 BRCA1、Rad51 蛋白的焦点形成百分比进行计算。进一步用流式细胞仪检测两种细胞系的细胞周期变化。结果 MCF7 细胞中野生型的 BRCA1 和 p53 主要分布于细胞核内, 这两种蛋白对 DNA 损伤反应有应答。10 Gy 8 h 照射条件下, MCF7 细胞系中 BRCA1 蛋白焦点形成百分比较无电离辐射高 $[(59.40 \pm 3.66)\% \text{ 比 } (11.80 \pm 3.51)\%, t = 16.26, P < 0.05]$; MCF7 细胞系照射组中 Rad51 蛋白焦点形成百分比较无电离辐射高 $[(73.90 \pm 8.66)\% \text{ 比 } (16.70 \pm 3.76)\%, t = 10.49, P < 0.05]$, 照射组 p53 蛋白 $[(82.54 \pm 1.04)\% \text{ 比 } (23.75 \pm 0.51)\%, t = 87.90, P < 0.05]$ 和 p21 蛋白 $[(90.95 \pm 1.13)\% \text{ 比 } (50.19 \pm 0.89)\%, t = 49.11, P < 0.05]$ 表达水平均较无电离辐射高, 细胞在 G1 期蓄积。与 MCF7 细胞相比, 在 HCC1937 细胞中的 BRCA1 和 p53 都产生了变异, 在细胞核内两种蛋白较少。10 Gy 8 h 照射条件下 HCC1937 细胞中无 BRCA1 蛋白焦点形成、p53 和 p21 几乎无诱导表达以及细胞在 G1 和 G2-M 期无明显的蓄积。当恢复野生型 BRCA1 在 HCC1937 细胞内表达后, 10 Gy 8 h 照射条件下 Rad51 蛋白焦点形成百分比较无电离辐射高 $[(61.70 \pm 4.03)\% \text{ 比 } (6.22 \pm 2.27)\%, t = 20.78, P < 0.05]$, 细胞在 G2-M 期的蓄积增多。结论 乳腺癌细胞系 HCC1937 和 MCF7 在应答 DNA 损伤修复反应时具有不同的功能特性。

【关键词】 乳腺肿瘤; BRCA1 蛋白质; DNA 损伤; HCC1937; MCF7

Comparative study on functional characters of MCF7 and HCC1937 cell lines in response to DNA damage Dong Chao, Zhang Fengmei, Zhao Xipeng, Guo Gongshe, Luo Yue, Feng Zhihui. Department of Environment Health, Public Health School, Shandong University, Jinan 250012, China
Corresponding author: Feng Zhihui, Email: fengzhihui@sdu.edu.cn

【Abstract】 Objective The functional characters of MCF7 and HCC1937 cell lines were compared through the activity of BRCA1 and p53 following DNA damage in order to provide more research evidence for the related studies in both breast cancer cell lines. **Methods** The protein level of BRCA1 and p53 in two breast cancer cell lines and the protein level of BRCA1 in MCF7, HCC1937 and HCC1937 wtBRCA1 breast cancer cell lines treated with 10Gy after 1 h, 4 h or 8 h were detected by western blotting analysis. The distribution and foci formation of BRCA1 in the cells were observed through immunostaining assay and the percentage of BRCA1 or Rad51 foci formation after ionizing radiation was calculated. Cell cycle profiling was analyzed using flow cytometry. **Results** Most of BRCA1 and p53 localized in nucleus, and both proteins responded to DNA damage in MCF7 cells. In MCF7 cells, BRCA1 and Rad51 foci formation respectively increased to $(59.40 \pm 3.66)\%$ from $(11.80 \pm 3.51)\%$ ($t = 16.26, P < 0.05$) and $(73.90 \pm 8.66)\%$ from $(16.70 \pm 3.76)\%$ ($t = 10.49, P < 0.05$) after 10 Gy 8 h; p53 and p21 protein level was further separately induced and enhanced to (82.54 ± 1.04) from (23.75 ± 0.51) ($t = 87.90, P < 0.05$) and $(90.95 \pm$

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.09.013

基金项目: 国家自然科学基金(81172527); 山东省科技发展计划(2013GGE27052)

作者单位: 250012 济南, 山东大学公共卫生学院环境健康系

通信作者: 凤志慧, Email: fengzhihui@sdu.edu.cn

1.13) from (50.19 ± 0.89) ($t=49.11, P<0.05$) after 10 Gy 8 h; and the cells were accumulated in G1 phase. In contrast to MCF7, in HCC1937 cell line, both of BRCA1 and p53 were defective in nucleus since both proteins were mutated; in response to DNA damage, BRCA1 foci formation was not found, p53 and p21 was not induced; there was no cell accumulation in both of G1-S and G2-M phases. However, after complementation of wild-type BRCA1 in HCC1937 cells, DNA damage-induced Rad51 foci formation increased to $(61.70 \pm 4.03)\%$ from $(6.22 \pm 2.27)\%$ ($t=20.78, P<0.05$) and accumulation of cells in G2-M phase was also restored after 10 Gy 8h, which was similar to that of in MCF7 cells. **Conclusions** We have identified that BRCA1 and p53 have dramatically different functions in MCF7 and HCC1937 cell lines in response to DNA damage.

【Key words】 Breast neoplasms; BRCA1 protein; DNA damage; HCC1937; MCF7

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。关于乳腺癌的发生、发展、预防和治理等方面的研究日益受到人们的重视和关注。与乳腺癌研究相关的细胞系有 41 种, 如 MCF7、HCC1937、MDA-MB-436、SUM149PT、MDA-MB-453 和 SUM1315MO2 等^[1-2]。如何选择和应用正确的细胞系是在细胞和分子生物学水平上进行乳腺癌相关研究时的关键因素之一。笔者以乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 和 p53 两种关键的抑癌基因为研究指标, 比较它们在 MCF7 和 HCC1937 两种常用乳腺癌细胞系中的表达、细胞内分布以及对 DNA 损伤修复反应的应答等方面特性, 揭示这两种细胞系功能上的差异, 为正确应用这两种细胞系进行乳腺癌相关研究提供重要的实验依据。

材料与方 法

1. 材料: MCF7 和 HCC1937 细胞系, 购自美国 American Type Culture Collection 公司; 野生型 BRCA1 (wild type BRCA1, wtBRCA1) 和空载体质粒由牛津大学 Simon Powell 博士馈赠。抗乳腺癌易感基因 1 D9 [BRCA1 (D9)]、Rad51 (H92) 和 p53 (DO1) 的抗体, 购自美国 Santa Cruz Technology 公司; 抗乳腺癌易感基因 1 Ab-1 [BRCA1 (Ab-1)]、p53 (Ab-7)、核孔蛋白 (nuclear pore) 的抗体, 购自美国 Calbiochem 公司; 抗 p21 的抗体, 购自美国 BD Pharmingen 公司; 抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 的抗体, 购自美国 Sigma 公司; 抗鼠二抗, 购自美国 Pierce 公司; 抗鼠、抗兔、抗羊荧光二抗, 购自美国 Invitrogen 公司。

2. 电离辐射 (ionizing radiation, IR) 条件: 6 mv X 射线, 吸收剂量率 2.33 Gy/min, 射野大小: 40 cm \times 40 cm, Primus S 型直线加速器 (德国西门子公司) 单次给予细胞 10 Gy 照射^[3-5]。

3. 细胞培养: MCF7 被培养于含体积分数为 10% 牛血清 (美国 Hyclone 公司) 的 DMEM 培养基

(美国 Gibco 公司), HCC1937 被培养于含体积分数为 15% 牛血清的 DMEM 培养基, 培养环境为 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱。HCC1937 细胞用 Lipofectamine 2000 (购自美国 Invitrogen 公司) 转染 wtBRCA1-pcDNA3 和 pcDNA3 空载体质粒后, 再用含 300 μ g/ml G418 (购自美国 Mediatech 公司) 体积分数为 15% 牛血清的 DMEM 培养基筛选出抗 G418 的单克隆细胞, 建立分别稳定表达 wtBRCA1 和空载体的 HCC1937 野生型 BRCA1 和 HCC1937 空载体细胞系^[3]。

4. 免疫印迹法检测蛋白含量及磷酸化水平: 分别将细胞接种于 p60 培养皿中, 待细胞贴壁后 IR 处理细胞。继续培养 6 h, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 1 000 \times g 离心 5 min 后弃上清, 再用 50 mmol Tris-HCl, pH 为 7.4, 150 mmol NaCl, 1 mmol EDTA, 体积分数为 1% 曲拉通 X-100 (Triton X-100) 配制裂解液提取细胞总蛋白, 经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 定量后, 将各样品蛋白浓度调至相同^[6]。取 80 μ g 总蛋白上样, 经 SPS-PAGE 处理后将蛋白转移到聚偏氯乙烯 (PVDF) 膜上, 用质量分数为 6% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜, 过夜后用 Tris 缓冲盐水 (TBS) 洗涤 3 次, 每次各 5 min, 加入用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h 后, TBS 洗涤 3 次, 每次各 10 min, 最后暗室显定影, 观察结果。以 β -actin 为内参对照, 采用 ImageJ 1.48 软件计算灰度值, 作为其蛋白相对表达量。

5. 免疫荧光染色: 细胞接种于 4 孔载玻片小室中, 待细胞贴壁后对细胞进行 10 Gy 照射, IR 处理后继续培养 6 h, 然后用体积分数为 4% 甲醛固定。用 PBS 冲洗 3 次, 在盖玻片上滴加 50 μ l 一抗稀释液, 4 $^{\circ}$ C 静置 1 h, 用 PBS 冲洗 3 次, 在盖玻片上滴加 50 μ l FITC 标记二抗稀释液, 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h, 用 PBS 冲洗 3 次, 最后 1 次冲洗时加入终浓度为 100 ng/ml 的 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-

phenylindole, DAPI), 染色 2 min, 染色结束后用 PBS 冲洗 2 次, 通过尼康 ELIPSE Ti-U 倒置生物显微镜 (日本 Nikon 公司) 进行观察。

6. 细胞周期检测: 取指数生长期细胞接种于 p60 培养皿中, 待细胞贴壁后 IR 处理细胞。继续培养 24 h 后, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min 后弃上清, 再加入体积分数为 70% 预冷冰乙醇固定过夜。固定后的细胞用核糖核酸酶 A (RNase A, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 美国 Sigma 公司)、碘化丙啶 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 美国 Sigma 公司) 以及 0.1% Triton X-100 配制的 PI 染色液室温下染色 30 min, 染色后的细胞通过流式细胞仪 (美国 BeckMan Coulter 公司) 检测细胞周期。

7. 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验均重复 3 次, 计量资料符合正态分布, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。BRCA1、p53 蛋白表达灰度值、焦点形成百分比服从正态分布且方差齐, 采用两独立样本比较 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 在未应答 DNA 损伤反应时, MCF7 和 HCC1937 细胞系中 BRCA1 的功能特性比较: western-blotting 结果显示见表 1, 在 MCF7 及 HCC1937 wtBRCA1 细胞系, 可识别 BRCA1 N-末端的 BRCA1 (Ab-1) 或 C-末端的 BRCA1 (D9) 的两种抗体均成功地检测到了 BRCA1 的蛋白表达, 且两种细胞的 BRCA1 的表达带在位置和形状上基本一致。在 HCC1937 细胞系, 应用 BRCA1 (Ab-1) 抗体检测到较弱的 BRCA1 表达带, 且位置下移; 而应用 BRCA1 (D9) 抗体未观察到该蛋白的表达。

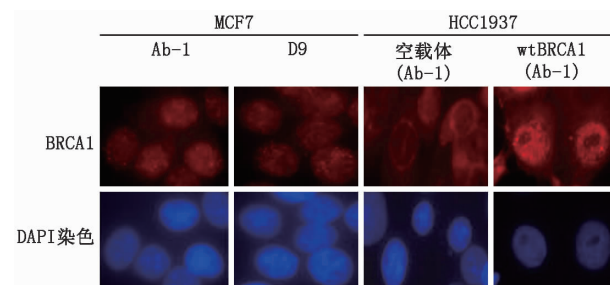
表 1 BRCA1 蛋白在 MCF7 和 HCC1937 细胞系中表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

检测指标	HCC1937		MCF7
	空载体	wtBRCA1	
BRCA1 (Ab-1)	30.95 \pm 1.20	99.73 \pm 0.87	142.89 \pm 1.06
BRCA1 (D9)	0	228.57 \pm 1.31	238.51 \pm 2.95
核蛋白	132.85 \pm 1.39	127.51 \pm 1.57	130.21 \pm 0.97

注: BRCA1: 乳腺癌易感基因 1; wtBRCA1: 野生型乳腺癌易感基因 1; BRCA1 (Ab-1) 和 BRCA1 (D9) 分别为识别 BRCA1 的 N-末端或 C-末端抗体

免疫荧光染色结果显示见图 1, 在 MCF7 细胞中, 应用 BRCA1 (Ab-1) 和 BRCA1 (D9) 两种抗体检测都能观察到 BRCA1 在细胞核内有较强的染色, 提示 BRCA1 蛋白以细胞核内分布为主。在 HCC1937

细胞, 应用 BRCA1 (Ab-1) 抗体未能在细胞核内观察到 BRCA1 的染色, 提示变异的 BRCA1 在细胞核内的分布缺失; 而在 HCC1937 wtBRCA1 细胞系中, BRCA1 在细胞核内的染色增强。



BRCA1: 乳腺癌易感基因 1; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; wtBRCA1: 野生型乳腺癌易感基因 1; Ab-1 和 D9 分别为识别 BRCA1 的 N-末端或 C-末端抗体; 应用这两种抗体通过免疫荧光方法对 BRCA1 进行染色, DAPI 用于染细胞核, MCF7 和 HCC1937 均为乳腺癌细胞系

图 1 免疫荧光染色观察 BRCA1 在 MCF7 和 HCC1937 细胞中的分布

2. 在应答 DNA 损伤反应时, MCF7 和 HCC1937 细胞系中的 BRCA1 功能特性比较: 结果如表 2 所示, 在无 IR 照射条件下, MCF7 细胞中 BRCA1 蛋白表达包括磷酸化 (BRCA1-p) 和非磷酸化 (BRCA1) 两种形式; 应答 DNA 损伤反应后 1 h, BRCA1 表达全部为 BRCA1-p 型 ($t = 336.37, P < 0.05$), 表达带明显上移, BRCA1 这一表现形式在 IR 照射后 8 h 仍能观察到。对于 HCC1937 细胞系, 如表 3 所示, 10 Gy 照射前后, 应用 BRCA1 (D9) 抗体均没有检测到其表达, 即使应用 BRCA1 (Ab-1) 抗体也难以观察到。但是, 当恢复 wtBRCA1 在 HCC1937 细胞系表达后, DNA 损伤后的 BRCA1 表达全部转化为磷酸化型 (表 3), 与其在 MCF7 细胞的变化一致。

表 2 不同照射时间下 BRCA1 蛋白在 MCF7 细胞中表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

照射时间 (h)	BRCA1-p	BRCA1	β -肌动蛋白
0	43.08 \pm 0.56	80.98 \pm 1.35	62.52 \pm 1.68
1	102.26 \pm 0.86	0	61.79 \pm 2.06
4	102.98 \pm 1.01	0	62.57 \pm 1.94
8	101.85 \pm 0.74	0	60.64 \pm 2.59

注: 表格中照射条件为 10 Gy; BRCA1: 乳腺癌易感基因 1; BRCA1-p: 磷酸化的乳腺癌易感基因 1 蛋白

免疫荧光法观察的结果如表 4 所示。无 IR 处理的 MCF7 细胞中含有 BRCA1 焦点形成 (BRCA1 foci formation) 的细胞数占总细胞的比例为

表 3 BRCA1 蛋白在 HCC1937 及 HCC1937 wtBRCA1 细胞中表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

检测指标	无照射		10 Gy 照射 8 h	
	空载体	wtBRCA1	空载体	wtBRCA1
BRCA1-p	0	0	0	31.10 ± 0.71
BRCA1	0	29.62 ± 0.75	0	0
β-肌动蛋白	104.71 ± 2.01	108.42 ± 0.17	107.40 ± 1.35	106.24 ± 1.38

注:BRCA1:乳腺癌易感基因 1;wtBRCA1:野生型乳腺癌易感基因 1;BRCA1-p:磷酸化的乳腺癌易感基因 1;10 Gy 8h 照射:10 Gy 照射 HCC1937 和 HCC1937 wtBRCA1 细胞后 8 h,用识别 BRCA1 C-末端的 D9 抗体检测蛋白表达

表 4 电离辐射诱导的 BRCA1、Rad51 蛋白焦点形成百分比(% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理方式	MCF7		HCC1937		HCC1937 wtBRCA1	
	BRCA1	Rad51	BRCA1	Rad51	BRCA1	Rad51
无电离辐射	11.80 ± 3.51	16.70 ± 3.76	0	1.14 ± 0.54	18.20 ± 3.88	6.22 ± 2.27
10 Gy 8 h 照射	59.40 ± 3.66	73.90 ± 8.66	0	12.80 ± 2.25	87.10 ± 5.94	61.70 ± 4.03
t 值	16.26	10.49	-	8.73	16.82	20.78
P 值	<0.05	<0.05	-	<0.05	<0.05	<0.05

注:BRCA1:乳腺癌易感基因 1;wtBRCA1:野生型乳腺癌易感基因 1;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶;10 Gy 照射 MCF7、HCC1937 和 HCC1937 wtBRCA1 细胞后 8 h,应用免疫荧光方法对 BRCA1、Rad51 蛋白进行染色,检测其细胞核内蛋白焦点形成情况,用 DAPI 染细胞核;如果细胞核内焦点数 ≥ 5 个,定为阳性细胞,统计阳性细胞在 500 个细胞内所占的比例;MCF7 和 HCC1937 均为人乳腺癌细胞系

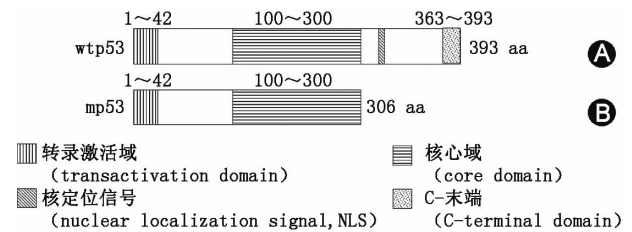
11.80%,10 Gy 照射后 8 h 这一比例增至 59.40% ($P < 0.05$)。在 HCC1937 细胞中,IR 处理前后均没有观察到 BRCA1 焦点形成;然而,恢复 wtBRCA1 蛋白在 HCC1937 细胞中表达后,IR-诱导的 BRCA1 焦点形成可由原来的 18.20% 升至 87.10% ($P < 0.05$),其表现与 BRCA1 在 MCF7 细胞中变化一致。

表 4 还显示,MCF7 细胞中含有 Rad51 的焦点(rad51 foci formation)的细胞数目占总细胞数的比例从 IR 前的 16.70% 升至 IR 后的 73.90% ($P < 0.05$)。但是,在 HCC1937 细胞中,Rad51 的焦点细胞数的比例由 IR 前的 1.14% 仅增至 12.80% ($P < 0.05$);在 HCC1937 细胞中有 wtBRCA1 表达后,IR 后 Rad51 的焦点形成的百分比由原来的 6.22% 增加至 61.70% ($P < 0.05$)。

3. p53 在 MCF7 和 HCC1937 细胞系中的表达和功能的比较:表 5 结果显示,在无 IR 处理的 MCF7 细胞中,p53 及其下游调控基因 p21 仅有较弱的表达;10 Gy 处理后 8 h,观察到 p53 和 p21 都有明显的协调一致性增加 ($P < 0.05$),表明 MCF7 细胞中的 p53 可被 DNA 损伤激活,并有能力通过调控其下游基因 p21 以应答 DNA 损伤反应,提示 MCF7 细胞中的 p53 状态为野生型 p53 (wild type p53, wtp53),wtp53 蛋白结构示意图见图 2A。在 HCC1937 细胞系中,检测到位置下移的 p53,其分子量接近 37.6 kD,p53 状态为变异型 p53 (mutation p53, mp53),mp53 蛋白结构示意图见图 2B;而且 IR 处理前后,mp53 表达无明显变化 ($P > 0.05$),其下游

基因 p21 未被诱导表达,表明在 HCC1937 中 mp53 无法激活其下游调控基因,细胞中 p53 ~ p21 通路功能缺失,无法应答 DNA 损伤反应。

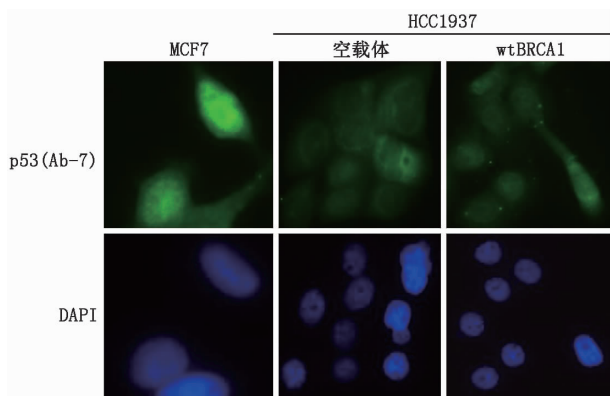
免疫荧光结果图 3 显示:p53 分布于 MCF7 整个细胞中,以细胞核内分布为主。但在 HCC1937 细胞中 p53 染色微弱,核内几乎无染色,即使恢复 wtBRCA1 在 HCC1937 细胞系中的表达,对 p53 染色也无影响。



mp53:变异型 p53 蛋白;wtp53:野生型 p53 蛋白;图 A MCF7 细胞系中 wtp53,由 393 个氨基酸残基组成;由四个主要功能区组成,包括转录激活域、核心域、核定位信号及 C-末端等;图 B HCC1937 细胞系中 mp53,由 306 个氨基酸残基组成,C-末端被截断,仅含有转录激活域和核心域

图 2 p53 及 mp53 的功能域示意图

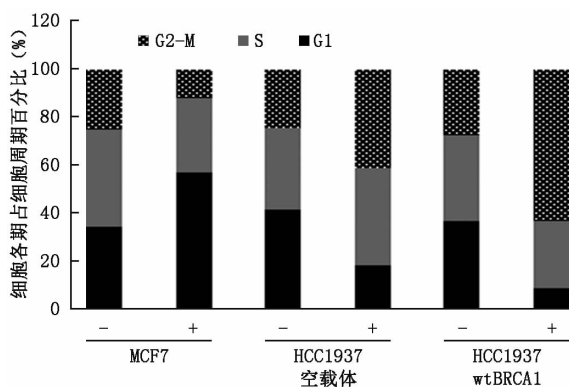
4. MCF7 和 HCC1937 细胞系细胞周期特性的比较:10 Gy 辐射处理 MCF7 细胞后 24 h,大多数细胞聚集在 G1 期,而蓄积在 S 和 G2-M 期的细胞相对较少,表明 p53 对细胞的 G1-S 期监测点有明显的调控作用,见图 4。对于 HCC1937 细胞,相同条件处理后大多数细胞聚集在 S 和 G2-M 期,而 G1 期相对较



wtBRCA1:野生型乳腺癌易感基因1;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶;应用 p53 (Ab-7) 抗体通过免疫荧光法对 MCF7 和 HCC1937 细胞中 p53 进行染色,DAPI 用于染细胞核

图3 免疫荧光染色分析 p53 在 MCF7 和 HCC1937 细胞内的分布

少,提示该细胞对 G1-S 期调控能力的缺失;但当恢复 wtBRCA1 在 HCC1937 细胞表达时,HCC1937 wtBRCA1 细胞在 G2-M 期进一步增多,提示 BRCA1 对 G2-M 期具有调控能力,而 HCC1937 细胞缺乏调控 G2-M 期监测点的能力。



wtBRCA1:野生型乳腺癌易感基因1;“+”:10 Gy 照射后 24 h;“-”:无电离辐射。应用流式细胞仪检测 MCF7、HCC1937 空载体及 HCC1937 wtBRCA1 细胞的细胞周期,对各细胞系中的 G1、S 及 G2-M 占整个细胞周期的百分比进行分析

图4 流式细胞术检测 MCF7 和 HCC1937 的细胞周期

表5 p53 蛋白在 MCF7 和 HCC1937 细胞中表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

检测指标	MCF7		HCC1937	
	无电离辐射	10 Gy 8 h 照射	无电离辐射	10 Gy 8 h 照射
p53	23.75 ± 0.51	82.54 ± 1.04 ^a	0	0
mp53	0	0	91.29 ± 0.70	95.91 ± 1.32 ^c
p21	50.19 ± 0.89	90.95 ± 1.13 ^b	0	0
β-肌动蛋白	93.44 ± 1.34	99.31 ± 2.05	94.13 ± 1.96	90.01 ± 2.78

注:mp53:变异型 p53 蛋白;p21:p21 蛋白;MCF7 和 HCC1937 均为人乳腺癌细胞系;与无电离辐射组比较;^at = 87.90, P < 0.05;^bt = 49.11, P < 0.05;^ct = 5.36, P > 0.05

综合上述实验结果,HCC1937 和 MCF7 两种乳腺癌细胞系在 DNA 损伤修复反应时功能的比较见表 6。

表6 MCF7、HCC1937 及 HCC1937 wtBRCA1 细胞系中与 BRCA1 和 p53 相关的功能状态比较

功能	MCF7	HCC1937	HCC1937 wtBRCA1
BRCA1 变异状态	wt	5382insC	wt
P53 变异状态	wt	306C 置换 T	306C 置换 T
BRCA1 核内分布	+	-	+
p53 核内分布	+	-	-
BRCA1 蛋白焦点形成	+	-	+
BRCA1 蛋白磷酸化	+	-	+
P53 蛋白表达增强	+	-	-
p21 激活	+	-	-
Rad51 焦点形成	+	-	+
G1-S 监测点	+	-	-
G2-M 监测点	+	-	+

注:BRCA1:乳腺癌易感基因1;wt:野生型;5382insC:BRCA1 的 5382 核苷酸位置被插入 C 碱基;306C 置换 T;p53 的 306 核苷酸位置的 T 碱基被 C 置换;“+”:相应的功能完整;“-”:相应的功能缺失

讨论

在细胞和分子生物学水平上进行乳腺癌相关研究时,选择和应用正确的乳腺癌细胞系是研究的关键因素之一^[7-10]。本研究中,笔者比较了 MCF7 和 HCC1937 两种关键的乳腺癌细胞系在 DNA 损伤修复中的功能特性。研究证明,在 MCF7 细胞中 BRCA1 和 p53 均是野生型时,两种蛋白以细胞核内分布为主;应答 DNA 损伤反应时,BRCA1 被磷酸化,p53-p21 通路激活、Rad51 所介导的 DNA 修复通路被活化、细胞的 G1-S 和 G2-M 期监测点完整。相反,在 HCC1937 细胞中,BRCA1 和 p53 基因变异(截断突变),变异的两种蛋白在细胞核内分布缺失、变异的 BRCA1 失去了对 DNA 损伤的应答能力、p53 ~ p21 通路失活、修复因子 Rad51 介导的 DNA 修复调控通路失活以及 G1-S、G2-M 期监测点也双重缺失。以上表明,MCF7 和 HCC1937 两种乳腺癌细胞系有功能性差异。

HCC1937 乳腺癌细胞系是 Tomlinson 等^[11] 在 1998 年建立的, 研究证明在这一细胞系中 BRCA1 和 p53 基因存在变异。笔者与其他学者的实验结果都证明变异的 BRCA1 和 p53 可导致 HCC1937 细胞系在应答 DNA 损伤修复反应时出现功能异常^[3,11-12], 如 BRCA1 不能有效地被磷酸化等, 可能与 BRCA1 状态有关。wtBRCA1 的磷酸化主要发生于 DNA 复制的 S 和 G2-M 期以及应答 DNA 损伤修复反应中^[7-8]。多种激酶如 ATM、ATR、CHK2 及 CDK 等, 都可直接影响 BRCA1 在其多个不同位点的磷酸化^[12], 进而调控其对 DNA 复制和 DNA 损伤修复反应过程的应答。目前的实验结果还证明 BRCA1 C-末端的两个 BRCT(BRCA1 C-terminus) 功能区在 DNA 复制和 DNA 修复反应中也起到关键的作用, 具有调节者的作用; 而且 BRCT 缺欠与乳腺癌的发生密切相关。在 HCC1937 细胞中, BRCA1 基因在 5382 核苷酸处被插入 C 碱基, 使其 C-末端在 1829 密码子处被截断, 导致 BRCT 功能区缺失, 致使 BRCA1 的表达不稳定且表达量很低, 通过免疫印迹法很难被检测到^[3] 或者所检测到的量相对较少。此外, 变异的 BRCA1 不能有效地接受和传导 DNA 损伤修复通路的信号, 不能行使调节者的作用。除了 HCC1937 细胞系, Elstrodt 等^[2] 在 2006 年从 41 种乳腺癌的细胞系中筛选鉴定出 MDA-MB-436、SUM149PT 和 SUM1315MO2 三种带有 BRCA1 变异的细胞系。Wasielewski 等^[1] 分析了这 41 种乳腺癌细胞中 p53 基因特点, 只有 9 种乳腺癌细胞系的 p53 是野生型, 包括 MCF7 细胞系; 有 32 种细胞系伴有 p53 的基因突变, 其中有 22 种细胞系含有 p53 的错义变异 (missense mutations); 有 10 种细胞系中 p53 是截断突变 (truncating mutation), 其中包括 HCC1937 细胞系。突变细胞系占整个被检测的 41 种乳腺癌细胞系的 78%, 进一步表明 p53 的基因变异在乳腺癌中很常见, 至于 p53 基因突变对细胞功能状态的影响, 尚需进一步深入的研究。

综上所述, 通过对 MCF7 和 HCC1937 两种乳腺癌细胞中 BRCA1 和 p53 诸多功能的鉴定和比较, 提示在应答 DNA 损伤修复反应时, 由于 BRCA1 和

p53 在 MCF7 和 HCC1937 细胞系中的功能不同, 直接导致这两种细胞系在应答 DNA 损伤修复反应时的功能特性差别。因而, 在应用相关的细胞系进行研究时, 对细胞系的基因背景应给予足够的重视和了解, 尤其是已经得到了学者们的普遍认可并广泛地应用于乳腺癌研究中的 MCF7 和 HCC1937 细胞系, 增加对其细胞系背景的认识显得更为重要, 本研究结果将为之提供实验依据, 具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Wasielewski M, Elstrodt F, Klijn JG, et al. Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines [J]. *Brest Cancer Res Treat*, 2006, 99(1):97-101.
- [2] Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel JH, et al. BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1):41-45.
- [3] Zhang J, Willers H, Feng Z, et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(2):708-718.
- [4] Feng Z, Zhang J. A dual role of BRCA1 in two distinct homologous recombination mediated repair in response to replication arrest[J]. *Nucl Acid Res*, 2012, 40(2):726-738.
- [5] Feng Z, Scott SP, Bussen W, et al. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2):686-691.
- [6] Feng Z, Kachnic L, Zhang J, et al. DNA damage induces p53-dependent BRCA1 nuclear export[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27):28574-28584.
- [7] Scully R, Chen J, Plug A, et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells[J]. *Cell*, 1997, 88(2):265-275.
- [8] Scully R, Chen J, Ochs RL, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage[J]. *Cell*, 1997, 90(3):425-435.
- [9] Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage[J]. *Nat Genet*, 2002, 30(3):285-289.
- [10] Ree AH, Bratland A, Nome RV, et al. Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1[J]. *Oncogene*, 2003, 22(55):8952-8955.
- [11] Tomlinson GE, Chen TT, Stastny VA, et al. Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(15):3237-3242.
- [12] Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(3):196-207.

(收稿日期:2014-02-28)

(本文编辑:郑湃)