

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.19.002

转录因子 Stat5a 对乳腺癌细胞增殖的影响及其表观遗传学机制探讨*

张 洁¹, 唐培志², 黄建军², 谭敦勇^{1△}

(1. 吉首大学医学院生物化学教研室, 湖南吉首 416000; 2. 湘西自治州人民医院外科, 湖南吉首 416000)

[摘要] 目的 探讨转录因子 Stat5a 对人类乳腺癌细胞(MCF-7)增殖的影响及表观遗传学机制。方法 利用腺病毒介导的基因转移技术,使 MCF-7 大量表达转录因子 Stat5a,应用活细胞计数(MTS)法检测细胞增殖情况,并以染色质免疫共沉淀(ChIP)方法,检测 p53 基因启动子区域组蛋白甲基化程度。最后以实时定量 PCR 进一步确认 p53 基因表达水平。结果 携带 Stat5a cDNA 的腺病毒感染后,MCF-7 的数量呈剂量依赖式地增加。当病毒感染增殖活性(MOI)分别为 10、20 及 30 时,MCF-7 的细胞密度较对照组细胞分别增加 7.603 1%、18.123 7% 及 24.898 7%。染色质免疫共沉淀分析表明,Stat5a 明显导致 p53 基因启动子区域组蛋白甲基化(H3K27Me3)增加,p53 基因表达水平下降。结论 Stat5a 导致 MCF-7 抑癌基因 p53 启动子组蛋白甲基化,使启动子活性降低,导致细胞的异常增殖。

[关键词] 转录因子 Stat5a; 乳腺肿瘤细胞; 表观遗传学; 组蛋白甲基化; 染色质免疫共沉淀

[中图分类号] R737.9.Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)19-2596-04

Influence of transcription factor Stat5a on proliferation of human breast cancer cells and its epigenetic mechanisms*

Zhang Jie¹, Tang Peizhi², Huang Jianjun², Tan Dunyong^{1△}

(1. Department of Biochemistry, Medical College of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China;

2. Department of Surgery, Hunan West Autonomous Region People's Hospital, Jishou, Hunan 416000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate and clarify the effect of Stat5a on proliferation of human breast cancer cells (MCF-7) and to detect the changes of epigenetic signature on the promoter region of p53 gene. **Methods** Stat5a was over expressed in human breast cancer cells (MCF-7) by using adenovirus mediated gene transfer technology. The cell proliferation was examined by MTS assay. ChIP assay was used to check the trimethylation of lysine 27 on histone 3 (H3K27Me3) of p53 gene promoter region. Furthermore, qRT-PCR and western blot were also applied to confirm the expression of p53 gene. **Results** The number of MCF 7 increased in a dose dependent manner. Compared with that of control group, the cell density of MCF-7 increased 7.603 1%, 18.123 7% and 24.898 7% when the MOI were 10, 20 and 30. Chromatin Immunoprecipitation showed that Stat5a significantly increased H3K27Me3 and down regulated the expression level of p53 gene. **Conclusion** Stat5a promotes proliferation of breast cancer cells through trimethylation of H3K27 and inhibition of p53 gene expression.

[Key words] Stat5a transcription factor; breast cancer cells; epigenetics; histone methylation; chromatin immunoprecipitation

转录因子 Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5) 是催乳素 (PRL)、生长因子以及一系列细胞因子信号通路的重要环节^[1-2], 在乳腺发育、分化^[3] 及泌乳^[4] 等生理活动中起着极为重要的作用^[5-6]。有证据表明, Stat5 的异常表达可能参与了某些生殖肿瘤尤其是乳腺癌及前列腺癌等的病理过程^[7]。但有关 Stat5 在乳腺癌及前列腺癌形成、发展及预后中的确切作用, 目前尚无定论, 且有关此方面的报道, 多相互矛盾^[8-9]。本研究除了检测及确认 Stat5a 对培养状态的人类乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响外, 利用染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析法, 分析高表达 Stat5a 后, p53 基因启动子区域表观遗传学修饰的改变 (组蛋白甲基化), 以期阐明 Stat5a 与乳腺癌的病理联系及其可能的表观遗传学机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人类乳腺癌细胞 (MCF-7, 中南大学细胞库)、RP-

MI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司)、H3K27Me3 抗体 (美国 Millimore 公司)、p53 抗体 (美国 Santa Cruz 生物公司)、细菌蛋白 G 磁珠 (美国 Invitrogen 公司)、细胞增殖分析试剂 MTS [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], 以及蛋白印迹显影试剂 ECL (enhanced chemiluminescent substrate, 美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 携带 Stat5a cDNA 腺病毒制作 为提高基因转移效率, 本研究采用腺病毒基因转移法。其制作方法依据 Strata-gene 公司建议的制作程序, 基本步骤如下: (1) 将 Stat5a cDNA 克隆至穿梭载体 (pShuttle-IRES-hrGFP-1); (2) 利用同源重组原理将穿梭载体的 Stat5a cDNA 上传到腺病毒基因组 (Ad5), 该病毒基因组经人工改造去掉其与病毒复制有关的 E1 及 E2 序列; (3) 确认重组成功后, 将其转入经特殊处理的细菌株 (XL10-Gold[®]) 大量扩增 (重组体在该细菌内只能扩增但不能

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172497, 81260396); 吉首大学研究生科研创新资助项目 (JGY201317)。作者简介: 张洁 (1988—), 硕士, 主要从事肿瘤的表观遗传学研究。△ 通讯作者, Tel: 15174302136; E-mail: naturet2010@163.com。

表 1 引物序列

引物用途	引物序列	
扩增 p53 启动子	5'-GAAGACCCAGGTCCAGAT-3'(S)/	5'-GGGAAGGGACAGAAGATGA-3'(A)
扩增 p53 mRNA	5'-TGACGGAGGTTGTGAGGC-3'(S)/	5'-TGTAGTTGTAGTGGATGGTGGT-3'(A)
扩增 18S rRNA	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'(S)/	5'-CCAGTCGGCATCGTTTATGG-3'(A)

再发生新的重组以保证重组的准确及稳定);(4)提取重组体,以限制性内切酶 *Pac* I 进行酶切处理以暴露其末端反向重复序列(invert terminal repeat, ITR),然后将其转入 AD-293 细胞,使其包装成有活性的病毒;(5)病毒活性(滴度)以病毒感染 AD-293 细胞后形成病毒斑块的能力(plaque forming unit, PFU)表示,而 PFU 总数与待感染的细胞总数之比值即为病毒感染增殖活性(multiplicity of infection, MOI)。

1.2.2 细胞培养、腺病毒介导的基因转移及活细胞计数(MTS)法 MCF-7 用 RPMI 1640 培养液(含 10.0% 胎牛血清)在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞的贴壁密度或贴壁面积为 70% 时,弃去培养液,用含 0.5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养细胞 24 h(细胞处于饥饿状态)以使所有细胞均处于 G₀ 期后,换为正常培养液,恢复 3 h 后,细胞分为 5 组:2 个对照组及 3 个实验组。2 个对照组的培养液中加入不携带 Stat5a cDNA 的腺病毒,3 个实验组加入携带 Stat5a cDNA 的腺病毒。3 个实验组及对照组中的一个均同时加入 PRL(50 ng/mL),继续培养 48 h 后,加入 MTS 试剂并测定其波长为 492 nm 的吸光度值,得到相对活细胞计数。

1.2.3 ChIP 分析 MCF-7 经病毒感染处理后,吸弃培养液,并以冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,然后:(1)以新鲜配制的 1% 甲醛固定,10 min 后,以甘氨酸终止甲醛活性;(2)吸弃甲醛固定液,以细胞收集液(100 mmol/L Tris-Cl, pH 9.4, 10 mmol/L DTT)收集细胞,冰冷 PBS 洗细胞 3 次,加入细胞裂解液(1% SDS, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.1, 1×蛋白酶抑制剂),并以超声粉碎仪(Bioruptor)破碎基因组 DNA 至 500 bp 左右片段;(3)以 ChIP 稀释液[1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl, pH 8.1, 1(蛋白酶抑制剂)]1:10 稀释;(4)加入 H3K27Me3 抗体,4 °C 轻摇过夜(与此同时,另设一平行管,加入 IgG 以得到非特异性结合的数据);(5)以含细菌蛋白 G 的磁珠沉淀;(6)以洗脱液(1% SDS, TE 缓冲液配制)将 DNA H3K27Me3 抗体复合物自磁珠上洗脱;(7)65 °C 过夜以解除固定,继之用蛋白酶 H 消化蛋白(抗体);(8)纯化 DNA;(9)实时定量 PCR(qRT-PCR)检测,确认被抗 H3K27Me3 抗体沉淀的 DNA 中 p53 基因启动子区域 DNA 序列的含量。

1.2.4 qRT-PCR 检测 (1)引物设计:用于本研究的 PCR 引物包括用于检测 ChIP 后 DNA 的引物(对应于 p53 基因启动子序列进行设计)及用于检测 p53 mRNA 的引物(表 1);(2)底物:SYNR Green;(3)PCR 参数:变性 95 °C 1 min,退火 55 °C, 30 s,延伸 72 °C, 30 s,收集 40 个循环的荧光强度,并得到相应的 Ct 值;(4)ChIP:DNA 的相对量以总 DNA 量(Input)为参照,计算其被沉淀的 p53 启动子序列 DNA 占总 DNA 量的百分数,p53 mRNA 的相对量则以管家基因 18S rRNA 为对照

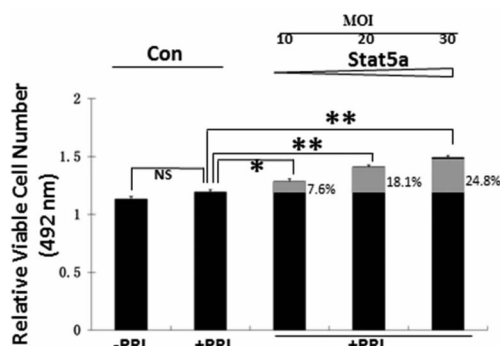
计算。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MCF-7 经携带 Stat5a cDNA 的腺病毒感染后,吸弃培养液,并经冰冷 PBS 洗 3 次,收集细胞并加入细胞裂解液(RIPA),12 000 r/min 离心,收集上清液,测定蛋白浓度,然后进行下述步骤。(1)电泳分离:样本加入上样液并经煮沸 5 min 变性,每孔上样 20 μg,100 V 电泳 90 min;(2)转膜:应用半干转膜装置(Bio-Rad)7 V 转膜 45 min;(3)抗原抗体反应:上述经蛋白转移后的硝酸纤维素膜,经磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗 3 次(每次 10 min)并经非特异位点封闭后,加入 p53 抗体,4 °C 过夜,第 2 天进行二抗反应;(4)显影:运用 ECL 试剂并经 X 线片记录发光强度及位置。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,呈正态分布者被视为有效数据,组间比较采用配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Stat5a 对人类乳腺癌细胞增殖的影响 2 组对照细胞,分别给予或不给予 PRL 处理后,二者之间的活细胞计数差异无统计学意义(*P* > 0.05)。3 组实验组细胞,则由于感染携带 Stat5a cDNA 的腺病毒,在加入 PRL 的情况下,其活细胞计数均明显增加,且与腺病毒的剂量(MOI)呈剂量依赖关系。当 MOI 分别为 10、20 及 30 时,MCF-7 的活细胞相对计数分别为 1.283 2 ± 0.025 9, 1.408 6 ± 0.019 2 及 1.489 4 ± 0.017 6,较对照组 2(Con 2)细胞分别增加 7.603 1%、18.123 7% 及 24.898 7%,见图 1。

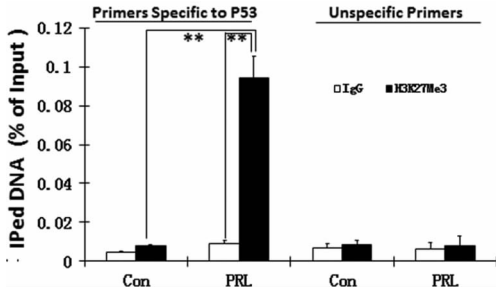


Con:对照组;NS:差异非显著;*:*P* < 0.05,**:*P* < 0.01,与对照组比较。

图 1 过表达 Stat5a 基因对人类乳腺癌细胞增殖的影响

2.2 Stat5a 对 MCF-7 p53 基因启动子组蛋白甲基化的影响 过表达 Stat5a 的细胞,其染色质沉淀中含有大量被抗 H3K27Me3 沉淀的 DNA 片段。对照组与实验组,其沉淀 DNA 比例分别为(0.007 8 ± 0.000 4)%及(0.094 0 ± 0.011 2)% (图 2)。为了消除非特异性结合的影响,本研究还使用了非特异性 IgG 抗体进行沉淀,结果表明所有组别的 DNA 沉淀比例均低于 0.009 0%。此外,为消除引物对基因组

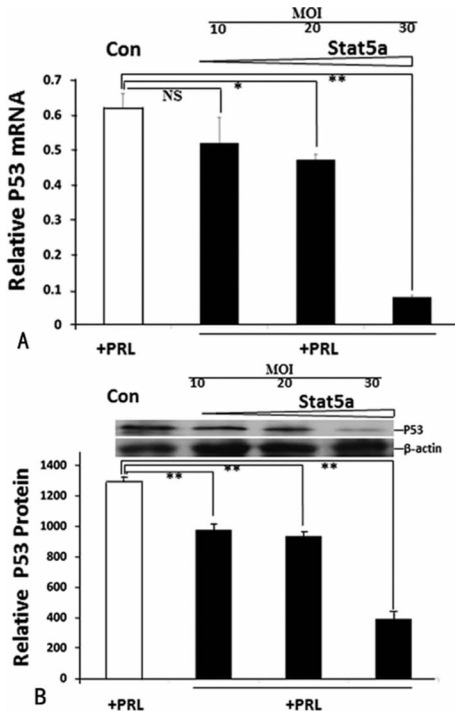
DNA 的非特异性结合的影响,本研究设计了平行实验,运用无关引物进行检测,结果表明,无关引物并没有检测到明显 DNA 片段,见图 2。



Con: 对照组; *: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 过表达 Stat5a 对乳腺癌细胞(MCF-7)p53 基因启动子组蛋白甲基化的影响

2.3 Stat5a 过表达对 p53 基因表达的影响 细胞在转入含有 Stat5a cDNA 的腺病毒后, p53 mRNA 及蛋白水平下降非常明显, 与对照细胞相比, 细胞在分别转入腺病毒 10、20、30 MOI 后, 对照组及 3 个实验组的 p53 mRNA 相对量分别为 0.620 ± 0.040 6, 0.519 ± 0.073 5, 0.471 ± 0.015 7 及 0.078 ± 0.004 9, 分别下降 16.225 8%、23.897 1% 及 87.267 1%。p53 蛋白则分别下降 24.650 3%、27.825 1% 及 69.784 1%, 见图 3。



A: p53 mRNA 表达水平 (qRT-PCR); B: p53 蛋白表达水平。

Con: 对照组; NS: 差异非显著; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 Stat5a 过表达对 p53 基因表达的影响

3 讨论

Stat5a 作为转录因子, 主要介导 PRL 等的生物学作用, 而 PRL 及其受体的过表达已经被证实是促进人类生殖系统癌症如乳腺癌及前列腺癌的发生、发展的重要原因之一^[1-4]。因而, 有人推测 Stat5a 与乳腺癌等的形成和发展之间存在一定的病

理联系^[8]。然而, 有关 Stat5a 在乳腺癌的形成、发展及预后方面的具体作用, 目前尚无定论。尽管已经有不少报道, 将 Stat5a 的表达与肿瘤联系起来, 但从报道的结果看, 往往相互矛盾^[8-9]。为确认 Stat5a 对 MCF-7 细胞增殖的影响, 本研究采用腺病毒介导的基因转移法使 MCF-7 细胞得以过表达 Stat5a。根据笔者以往经验, 在基因转染过程中, 若采用化学转移法人类乳腺癌细胞系如 T47D 及 MCF-7 的转移效率较低 (约 50%), 因而影响实验结果。本研究采用腺病毒介导的基因转移法, 理论上转移效率可以达到 90% 以上。结果表明, MCF-7 的细胞密度, 过量表达 Stat5a 之后, 显著上升, 且呈剂量依赖关系。此外, 由于 PRL 是 Stat5a 的有效激活剂, 笔者设置了两组对照, 两组对照均以不携带 Stat5a cDNA 的腺病毒进行转染, 其中一组细胞不加入 PRL, 而另一组对照则加入 PRL 以激活 Stat5a。结果发现, 加入 PRL 的对照组, 虽然没有过量表达外源 Stat5a, 但细胞密度亦有少量增加, 应为 PRL 激活内源性 Stat5a 所致。本研究结果发现, 至少在细胞增殖方面, Stat5a 所起作用为病理性的。

p53 是调控细胞周期的关键因子之一, 其表达与乳腺癌的发生、发展及预后有一定关系^[10-11]。为阐明 Stat5a 的促进细胞增殖作用是否与 p53 有关, 本研究运用 ChIP, 对过表达 Stat5a 后的乳腺癌细胞 p53 基因启动子区域的表现遗传学修饰进行了检测。在携带 Stat5a cDNA 的腺病毒转染, 并经 1% 甲醛固定后, MCF-7 染色质 DNA 经超声粉碎至 500 bp 左右片段, 以抗 H3K27Me3 抗体对 DNA 片段进行沉淀。结果表明, p53 基因启动子区域 DNA 被大量沉淀, 说明过表达 Stat5a 能够促进 p53 基因启动子区域组蛋白 3 第 27 位赖氨酸的甲基化 (H3K27Me3) 修饰。H3K27Me3 对基因组 DNA 与组蛋白的相互作用具有非常直接的影响, 大量研究表明, 这一修饰能够严重干扰与转录有关的蛋白质因子进入基因启动子区域, 从而抑制基因的转录表达^[12]。为确认 H3K27Me3 对 p53 基因表达的影响, 本研究应用 qRT-PCR 对 p53 mRNA 进行检测, 结果正如预期, p53 mRNA 水平随着病毒量的增加而降低, 应为 p53 基因启动子因甲基化而被抑制的结果。蛋白印记进一步显示, 蛋白水平亦下降明显。

综上所述, Stat5a 有促进 MCF-7 增殖的作用, 其分子机理之一是通过改变 p53 启动子区域的组蛋白表现遗传学修饰, 促进 H3K27Me3 甲基化, 从而抑制 p53 基因的表达。

参考文献

- [1] 谭敦勇, 彭湘萍. 催乳素受体研究[J]. 生理科学进展, 2012, 43(1): 17-23.
- [2] Tan DY, Johnson DA, Wu W, et al. Unmodified prolactin (PRL) and S179D PRL-initiated bioluminescence resonance energy transfer between Homo- and Hetero-pairs of long and short human prolactin receptors in living human cells[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(5): 1291-1303.
- [3] Tweardy D, Chang JC. Stat5: from breast development to cancer prognosis, prediction, and progression[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(18): 2443-2444.
- [4] Reichenstein M, Rauner G, Barash I. Conditional repres-

- sion of STAT5 expression during lactation reveals its exclusive roles in mammary gland morphology, milk-protein gene expression, and neonate growth [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(8):585-596.
- [5] Liao ZY, Levaneinen MT. Targeting transcription factor stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2011, 3(2):133-138.
- [6] Liao Z, Nevalainen MT. Targeting transcription factor Stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2011, 3(2):133-138.
- [7] Martini M, Hohaus S, Petrucci G, et al. Phosphorylated STAT5 represents a new possible prognostic marker in hodgkin lymphoma[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(3):472-477.
- [8] Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, et al. Transcription factor Stat5 stimulates homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(5):746-760.
- [9] Nam S, Williams A, Vultur A, et al. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4):1400-1405.
- [10] Barros P, Lam EW, Jordan P, et al. Rac1 signalling modulates a STAT5/BCL-6 transcriptional switch on cell-cycle-associated target gene promoters[J]. *Nucl Acids Res*, 2012, 40(16):7776-7787.
- [11] Lara JF, Thor AD, Dressler LG, et al. P53 Expression in node-positive breast cancer patients: results from the cancer and leukemia group B 9344 trial (159905)[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(15):5170-5178.
- [12] Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1):59-65.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-02-20)

(上接第 2595 页)

- Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor [J]. *Lipids Health Dis*, 2012 (11):76.
- [7] Bauer I, Bauer M, Raddatz A, et al. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients of severe sepsis [J]. *Anaesthesist*, 2006, 55(5):515-527.
- [8] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. *Nature*, 2002, 420(6917):885-891.
- [9] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China[J]. *Crit Care Med*, 2007(35):2538-2546.
- [10] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12):958-969.
- [11] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization[J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(12):677-686.
- [12] Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, et al. Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9):6153-6160.
- [13] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(6):493-506.
- [14] Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology[J]. *FASEB J*, 2003, 17(14):1975-1985.
- [15] 张红, 周静, 姜政. 白藜芦醇联合化疗药物抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖作用研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(28):2812-2814.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-03-26)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。