

文章编号:1005-6947(2008)05-0458-04

· 基础研究 ·

# BRMS1 在不同转移性乳腺癌细胞中的表达及其与 HDAC 活性的关系

徐杨荣, 梁庆模, 唐悦锋, 廖建

(湖南省岳阳市第二人民医院 普通外科, 湖南 岳阳 414000)

**摘要:**目的 探讨肿瘤转移抑制基因(BRMS1)在不同转移性乳腺癌细胞中的表达及其与组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性的关系和意义。方法 采用 RT-PCR 技术检测 3 种细胞株[非转移性 MCF-7(A 株),低转移性 MDA-MB-453(B 株),高转移性 MDA-MB-231(C 株)]中 BRMS1 基因的表达。用 Western blot 检测在上述 3 种细胞株中 BRMS1 蛋白的表达。ELISA 检测 3 种细胞株中 HDAC 的活性。结果 (1)在 A、B、C 3 种细胞株中 BRMS1 基因表达依次比例为 3.1:2.0:1.0。C 细胞株比 A 细胞株 BRMS1 基因表达降低 2.1 倍, BRMS1 基因表达随转移程度的增高而明显降低( $P < 0.001$ )。(2)在 A、B、C 3 种细胞株中 BRMS1 蛋白表达依次比例为 3.2:1.9:1.0。C 细胞株比 A 细胞株 BRMS1 蛋白表达降低 2.2 倍, BRMS1 随转移程度的增高而明显降低( $P < 0.001$ )。(3)A、B、C 3 种细胞株中 HDAC 活性依次比例为 1.0:1.8:2.6。C 细胞株比 A 细胞株 HDAC 活性增高 1.6 倍,随转移程度的增高 HDAC 活性升高( $P < 0.001$ )。结论 (1)BRMS1 基因和蛋白的表达在 3 种细胞株中随转移程度的增高而呈递减趋势。(2)HDAC 活性在 3 种细胞株中随转移潜能的增高而呈递增趋势;提示 BRMS1 可能通过参与调节 HDAC 活性调控乳腺癌的转移。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(5):458-461]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; 肿瘤转移; BRMS1; HDAC

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

## Expression of BRMS1 in different metastatic breast cancer cells and its relation to HDAC activity

XU Yangrong, LIANG Qingmo, TANG Yuefeng, LIAO Jian

(Department of General Surgery, the Second Municipal Hospital of Yueyang, Yueyang, Hunan 414000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of BRMS1 in different metastatic breast cancer cells and its relation to HDAC activity. **Methods** The gene expression of BRMS1 in 3 types breast cancer cell lines [non-metastasis MCF-7 (A cell line), low metastasis MDA-MB-453 (B cell line) and high metastasis MDA-MB-231 (C cell line)] was determined by RT-PCR technique; the protein expression of BRMS1 was measured with Western blot technique and HDAC activity by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** (1) Gene expressive ratio of BRMS1 was 3.1:2.0:1.0 in the A、B、C cell lines, respectively. The gene expression of BRMS1 in the C cell line decreased 210% compared to A cell line, and expression of BRMS1 was markedly reduced as the degree of metastasis increased ( $P < 0.001$ ). (2) protein expression ratio of BRMS1 was 3.2:1.9:1.0 in the A、B、C cell lines. The protein expression of BRMS1 in the C cell line decreased by 220% compared to A cell line, and protein expressive of BRMS1 was reduced in relation to metastasis degree of breast cancer cell line ( $P < 0.001$ ). (3) HDAC activity ratio was 1.0:1.8:2.6 in the A、B、C cell lines. HDAC activity in the C cell line increased 160% compared to A cell line, HDAC

收稿日期:2008-03-15; 修订日期:2008-04-13。

作者简介:徐杨荣,男,湖南省岳阳市第二人民医院主治医师,主要从事胃肠外科方面的研究。

通讯作者:徐杨荣 E-mail:xuyanron@163.com

activity increased in relation to metastasis degree of the cell line ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** (1) Gene and protein expression of BRMS1 is reduced according to the metastasis degree increasing of the cell line. (2) HDAC activity increases with increase of degree of metastasis of the 3 cell types, and suggests that BRMS1 may regulate breast cancer metastasis via HDAC activity.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(5):458-461 ]

**Key words:** Breast Neoplasms/pathol; BRMS1; HDAC

**CLC number:** R 737.9

**Document code:** A

肿瘤的主要死因是瘤细胞从原发灶转移到邻近和远隔器官,因此了解肿瘤转移所涉及的基因和基因产物是目前一项重要的研究课题。肿瘤转移抑制基因(BRMS1)可以抑制恶性肿瘤细胞转移,其作用机制与组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的活性有关<sup>[2]</sup>。本实验通过检测3种细胞株(非转移性、低转移性、高转移性)中BRMS1基因和蛋白的表达,并检测该3种细胞株中HDAC的活性,观察不同转移潜能的乳腺癌细胞株中BRMS1的表达情况及其与HDAC活性的关系,以探讨两者在乳腺癌转移机制中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系 MCF-7(乳腺癌无转移性细胞株,A株)购自武汉大学细胞库,MDA-MB-453(乳腺癌低转移性细胞株,B株)和MDA-MB-231(乳腺癌高转移性细胞株,C株)均购自中南大学湘雅医学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 逆转录(RT)试剂盒购自美国MRI公司;聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自天为时代科技有限公司;Trizol及DEPC试剂购自加拿大BBI公司;免疫印迹(Western blot)荧光检测试剂盒和Protein A/G PLUS-Agarose购自Santa Cruze公司;鼠抗人BRMS1单克隆抗体和兔抗鼠 $\beta$ -actin多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

将3种细胞放在含10%灭活小牛血清、100 U/mL青霉素和10  $\mu$ g/mL链霉素的1 640完全培养基中,置于37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>的培养箱内培养。细胞经传代和收集,取对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 RT-PCR检测BRMS1 mRNA的表达 用Trizol一步法提取细胞总RNA,半定量RT-PCR方法检测上述3种细胞株中BRMS1 mRNA的表达;

其中BRMS1及内参照 $\beta$ -actin基因引物序列和具体步骤见文献<sup>[3]</sup>。

1.3.2 Western blot检测BRMS1 mRNA蛋白 提取蛋白质样品(50  $\mu$ g总蛋白量/泳道)加入等体积上样缓冲液和10% $\beta$ -巯基乙醇,100  $^{\circ}$ C煮5 min,10% SDS-PAGE电泳(积层胶60 mV,分离胶120 mV)后电转移(100 mA 2h或60 mA 3h)至PVDF膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,1:1 000加入小鼠抗人Brms1和兔抗鼠 $\beta$ -actin多克隆抗体( $\beta$ -actin为参照物),4  $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗涤15 min,每5 min换液1次。1:2 000加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG和羊抗兔IgG,室温孵育1 h(或37  $^{\circ}$ C 30 min);TBST洗涤30 min,每10 min换液1次。浸入含化学发光试剂A,B的水溶液中激发荧光,在暗室中压片,然后显影、定影。

1.3.3 HDAC活性检测 采用HDAC活性试剂盒检测,HDAC活性检测方法见王雪梅<sup>[4]</sup>的报道。分别收集MCF 7,MDA MB 453及MDA MB 231细胞,用HDAC酶联免疫吸附法ELISA检测HDAC在3种细胞中的活性。

### 1.4 统计学处理

使用SPSS12.0统计软件。资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )记录。数据用单因素方差分析F检验,两两比较采用q检验。统计学意义水平界定为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 3种细胞株中BRMS1基因的表达

BRMS1 mRNA在MCF-7(A株)中表达水平( $2.26 \pm 0.05$ )明显高于在MDA-MB-453(B株)( $1.44 \pm 0.03$ )和MDA-MB-231(C株)中的表达( $0.73 \pm 0.06$ )。在A,B,C3种细胞株中BRMS1基因表达比例依次为3.1:2.0:1.0,C细胞株BRMS1基因表达比A细胞株降低2.1倍,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。两两比较差异均有显著性( $P < 0.01$ )(图1)。

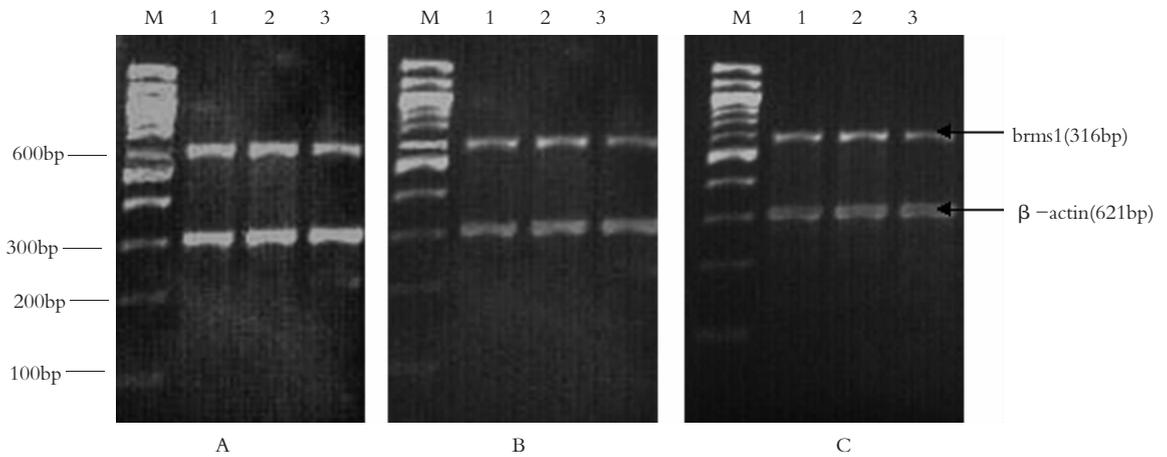


图1 MCF-7,MDA-MB-453,MDA-MB-231 中 BRMS1mRNA 表达 M:mark; $\beta$ -actin:内参照;A:MCF-7 细胞株;B:MDA-MB-453 细胞株;C:MDA-MB-231 细胞株;1,2,3:同种细胞重复3次结果

## 2.2 3种乳腺癌细胞株中 BRMS1 蛋白的表达

BRMS1 蛋白在 MCF-7 中表达水平 ( $1.36 \pm 0.04$ ) 明显高于在 MDA-MB-453 中表达 ( $0.85 \pm 0.01$ ) 和 MDA-MB-231 中表达 ( $0.43 \pm 0.07$ ), 在 A, B, C 3 种细胞株中 BRMS1 基因表达比例依次为 3.2:1.9:1.0。C 细胞株比 A 细胞株 BRMS1 蛋白表达降低 2.2 倍。两两比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

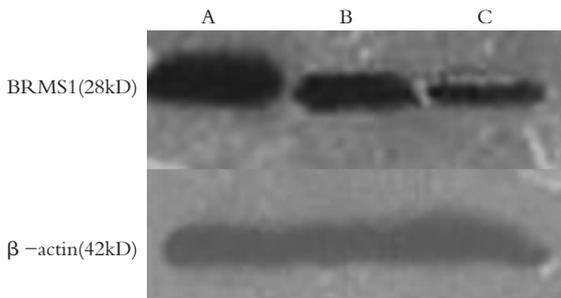


图2 MCF-7,MDA-MB-453,MDA-MB-231 中 BRMS1 蛋白的表达  $\beta$ -actin:内参照;A:MCF-7 细胞株;B:MDA-MB-453 细胞株;C:MDA-MB-231 细胞株

## 2.3 HDAC 活性检测结果

HDAC 活性 MCF-7 < MDA-MB-453 < MDA-MB-231, 3 组间两两比较均有显著性差异 (均  $P < 0.01$ ) (表 1)。

表1 HDAC 活性在 3 种乳腺癌细胞株中的结果 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )

组别	HDAC 活性( $\bar{x} \pm s$ )
MCF-7 (A)	$0.245 \pm 0.045$
MDA-MB-453 (B)	$0.442 \pm 0.062^{1)}$
MDA-MB-231 (C)	$0.636 \pm 0.089^{1),2)}$

注:1)与 A 组比较, $P < 0.01$ ; 2)与 B 组比较, $P < 0.01$ 。3 组两两比较均有显著性 ( $P < 0.01$ )

## 3 讨论

乳腺癌的病死率已占女性恶性肿瘤的首位, 世界卫生组织将其列为威胁女性健康的“头号杀手”。乳腺癌具有远处转移的特性。若肿瘤局限在乳腺, 其 5 年生存率超过 90%, 而当癌细胞发生远处转移时, 其 5 年生存率低于 20%<sup>[5]</sup>。研究发现, 乳腺癌早期已有血行转移, 因而影响乳腺癌的疗效<sup>[6]</sup>。因此, 乳腺癌转移的研究具有普遍意义。

BRMS1 具有抑制肿瘤细胞远处转移的作用, BRMS1 mRNA 表达下降或缺失可使乳腺癌的转移能力增强<sup>[7]</sup>。研究发现在多种肿瘤中都存 BRMS1 基因, 其表达下降可使肿瘤转移性增高。Shevde 等<sup>[8]</sup>的实验表明: BRMS1 mRNA 在人正常黑色素细胞中高表达, 在早期黑色素瘤细胞株中显著下降, 而在晚期转移黑色素瘤细胞株中则几乎不能检测到 BRMS1 mRNA。将 BRMS1 cDNA 转染人黑色素瘤细胞株中并不改变肿瘤的形成能力, 但可显著地抑制肿瘤转移的发生<sup>[9]</sup>。Saunders 等<sup>[10]</sup>将 BRMS1 cDNA 转染到乳腺癌细胞系 MDA-

MB-435 和 MDA-MB-231 中,发现转染 BRMS1 乳腺癌细胞动物肺转移明显减少。本研究检测 3 种转移性不同的人乳腺癌细胞株 BRMS1 基因及蛋白表达的结果显示:BRMS1 基因在 3 种细胞株中的表达随转移程度的增高明显降低;高转移性细胞株比无转移性细胞株 BRMS1 基因表达降低 2.1 倍。BRMS1 蛋白检测结果显示:BRMS1 蛋白在高转移性细胞株比无转移性细胞株表达降低 2.2 倍。两者均有统计学意义。本实验结果显示,BRMS1 基因及蛋白表达量降低则恶性肿瘤转移性增高,故其可作为临床判断乳腺癌转移性的一个指标。笔者认为,常规检测乳腺癌中 BRMS1 基因和蛋白表达水平,并与其他指标结合,有助于判断乳腺癌细胞的恶性程度及转移性,可为临床正确判断乳腺癌的转移、分期和选择综合治疗方案提供参考。

基因有序的转录调控是机体细胞维持正常功能的前提,如果这一功能紊乱,细胞可能发生癌变和使癌变的细胞发生转移。HDAC 作为调控基因转录的关键蛋白酶,其功能异常被证实与肿瘤的发生和发展有直接关系<sup>[11]</sup>。HDAC 活性在肿瘤转移过程中起重要作用,肿瘤转移调控相关基因可调控 HDAC 活性,同时 HDAC 活性可调节一些肿瘤转移相关基因的表达<sup>[12-13]</sup>。BRMS1 是 HDAC 复合体的一部分,其 C-末端 42 个氨基酸具有稳定 HDAC 复合体的功能并抑制 HDAC 活性<sup>[2]</sup>。本研究结果显示:在 3 种细胞株中 HDAC 活性随转移潜能的增高而逐渐升高,高转移性细胞株比无转移性细胞株 HDAC 活性增高达 1.6 倍。这表明 HDAC 活性与乳腺癌细胞转移有密切关系。当 BRMS1 表达降低,则其抑制 HDAC 活性的功能减弱,从而使 HDAC 活性升高,HDAC 活性升高引起基因有序的转录调控发生紊乱,从而使一些肿瘤转移相关基因的转录发生变化,使乳腺癌更具有浸润性和转移性。

#### 参考文献:

[1] 唐鲁兵,孙靖中,马榕,等. BRMS1 mRNA 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志,2007,16(1):58-60.

- [2] Samant James E, William J, Rajeev S, *et al.* Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription [J]. *J Biol Chem.*, 2004, 279(2):1562-1569.
- [3] 林其德,张殊,狄文. BRMS1 和 fascin 基因在卵巢上皮癌中的表达及其意义[J]. 现代妇产科进展,2003,57(2):163-167.
- [4] 王雪梅,陈彪,文敏,等. 组蛋白脱乙酰化酶在  $\alpha$ -突触核蛋白抑制酪氨酸羟化酶表达中的作用[J]. 首都医科大学学报,2006,4(2):122-128.
- [5] Welch DR, Steeg PS, Rinker Schaeffer CW, *et al.* Molecular biology of breast cancer metastasis genetic regulation of human breast carcinoma metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2000,26(13):408-416.
- [6] Parvanova V, Pandova V, Mogli A, *et al.* Treatment results and predictors of local recurrences after breast conserving therapy in early breast carcinoma [J]. *J Buon*, 2003,8(3):241-246.
- [7] Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, *et al.* Functional evidence for a novel human an carcinoma metastasis suppressor (BRMS1) encoded at chromosome 11q13 [J]. *Cancer Res*, 2000,60(1):2764-2769.
- [8] Shevde LA, Samant RS, Goldberg SF, *et al.* Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene (BRMS1) [J]. *Exp Cell Res*, 2002,273(2):229-235.
- [9] Seraj MJ, Harding MA, Gildea JJ, *et al.* The relationship of BRMS1 and RhoGD12 gene expression to metastatic potential lineage related human bladder cancer cell lines [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000,18(6):519-553.
- [10] Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, *et al.* Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospesific and heterospesific gap junctional intercellular communication [J]. *Cancer Res*, 2004,61(5):1765-1794.
- [11] Christina Karamboulas, Albert Swedani, Chris Ward, *et al.* HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage [J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(84):4305-4314.
- [12] Hamsen JC, Tse C, Wolffe AP, *et al.* Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye [J]. *Bio Chem*, 2002,37(51):17637-17641.
- [13] Grunstein M, Rocchini C, Ausio J, *et al.* Histone acetylation in chromatin structure and transcription [J]. *Nature*, 2002, 389(129):349-352.