

· 论著 ·

SASH1 基因通过 p53 信号通路调节乳腺癌细胞增殖

邝中淑¹ 曾兴¹ 王萍² 罗黄超¹ 马江淑¹ 陈梅¹ 李艳¹ 周定安³ 郑晓东⁴

【摘要】 目的 探讨 SASH1 基因对乳腺癌细胞增殖的作用及其与 p53 基因的关系。**方法** 购买 134 例乳腺癌组织芯片(上海芯超科技有限公司,芯片型号:HBre-Duc150Sur-01),用 SASH1 和 p53 抗体进行组织芯片免疫组织化学染色分析。构建重组质粒 SASH1-PEGFP-C3 (GFP-SASH1)、HA-p53-pcDNA3.0 (HA-Tp53),定点突变 SASH1 基因上 581、594、605、610 位点(D581V-SASH1、W594L-SASH1、F605S-SASH1、V610E-SASH1)和 p53 基因上 175、248、273 位点(R175H-p53、R248W-p53、R273H-p53)。实验分组如下:(1)将 0、0.5、1.0、2.0、4.0 μg 的 HA-Tp53 单独转染或分别与 2.0 μg 的 GFP-SASH1 共同转染至 HEK-293T 细胞,用 Western blot 检测 p53 对 GFP-SASH1 和 endo-SASH1 表达的影响。(2)将 0、0.5、1.0、2.0、4.0 μg 的 GFP-SASH1 单独转染或分别与 2.0 μg 的 HA-Tp53 共同转染至 HEK-293T 细胞,用定量 RT-PCR 检测 p53 mRNA 及蛋白表达。(3)2.0 μg 的 HA-pcDNA3.0 (空载体),野生型 p53 (wt-p53),突变型 R175H-p53、R248W-p53、R273H-p53 单独转染或分别与 2.0 μg 的 GFP-SASH1 共同转染至 HEK-293T 细胞,用 Western blot 检测 GFP-SASH1 和 endo-SASH1 表达。(4)将 2.0 μg 的空载体,野生型-SASH1,突变型 D581V-SASH1、W594L-SASH1、F605S-SASH1、V610E-SASH1 单独转染或与 2.0 μg 的 HA-Tp53 共同转染 HEK-293T 细胞,另设未经处理细胞为空白对照,Western blot 检测 HA-Tp53 和 endo-Tp53 表达。用 Spearman 相关系数法对 SASH1 与 p53 免疫组织化学结果进行分析,用单因素方差分析方法比较 SASH1 与 p53 的表达量,两两比较采用 LSD-*t* 法。**结果** 在 134 例人乳腺癌组织芯片中,SASH1 和 p53 的表达呈正相关($r=0.319$, $P<0.001$)。其中,SASH1 (-)4 例、(+)42 例、(++)67 例、(+++)20 例、(++++)1 例,p53 (-)82 例、(+)36 例、(++)10 例、(+++)6 例。随着 HA-Tp53 转染剂量的增大,外源性 SASH1 (GFP-SASH1) 和内源性 SASH1 (endo-SASH1) 的表达水平都增高($F=205.369$ 、 178.238 , P 均 <0.001)。随着 GFP-SASH1 转染剂量的逐渐增大,HA-Tp53 mRNA 及蛋白表达量逐渐增加($F=67.481$ 、 506.538 , P 均 <0.001)。突变型 SASH1 使内源性和外源性 p53 表达上调($F=165.767$ 、 1136.930 , P 均 <0.001);突变型 p53 抑制内源性和外源性 SASH1 表达($F=57.142$ 、 354.517 , P 均 <0.001)。**结论** SASH1 与 p53 正相关,对乳腺癌细胞增殖起调节作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; p53 基因; SASH1 蛋白质,人

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

SASH1 regulates proliferation of breast cancer cells via p53 signaling pathway Kuang Zhongshu¹, Zeng Xing¹, Wang Ping², Luo Huangchao¹, Ma Jiangshu¹, Chen Mei¹, Li Yan¹, Zhou Ding'an³, Zheng Xiaodong⁴. ¹Department of Clinical Medicine, Fifth College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Department of Emergency, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610083, China; ³Department of Laboratory Medicine, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ⁴Department of Breast Diseases, Chongqing Cancer Hospital/Institute, Chongqing 400030, China

Corresponding author: Zheng Xiaodong, Email: zxd052005@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of SASH1 gene in the proliferation of breast cancer cells

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2016.05.004

基金项目:重庆市科技计划项目(cstc2013jcsf0143);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2016shmszx0047)

作者单位:402160 重庆医科大学第五临床学院临床医学系¹;610083 成都军区总医院急诊科²;402160 重庆医科大学附属永川医院检验科³;400030 重庆市肿瘤医院/肿瘤研究所乳腺科⁴

通信作者:郑晓东,Email: zxd052005@sohu.com

and its relationship with p53 gene. **Methods** Totally 134 cases of breast cancer tissue microarrays were purchased from Shanghai Xinchao Technology Co., No. HBre-Duc150Sur-01), conjugated with SASH1 or p53 antibody for immunohistochemistry. HA-p53-pcDNA3.0 (HA-Tp53) and SASH1-PEGFP-C3 (GFP-SASH1) recombinant plasmid were constructed by gene cloning. D581V, W594L, F605S and V610E mutants of SASH1 gene and R175H, R248W, R273H mutants of p53 gene were generated by the associated mutagenesis primers and mutagenesis kit. Experimental grouping was as follows: (1) the different dosages (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μg) of HA-Tp53 were transfected alone or co-transfected with 2.0 μg of GFP-SASH1 into HEK-293T cells. Western blot was used to detect the expressions of GFP-SASH1 and endo-SASH1. (2) The different dosages (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μg) of GFP-SASH1 were transfected alone or co-transfected with 2.0 μg HA-Tp53 into HEK-293T cells. The quantitative RT-PCR was used to detect the p53 mRNA and protein expressions. (3) The 2.0 μg of HA-pcDNA3.0 (empty vector), wild-type p53 (wt-p53), R175H-p53, R248W-p53 or R273H-p53 was transfected into HEK-293T cells alone, or together with 2.0 μg of GFP-SASH1. Western blot was used to detect GFP-SASH1 and endo-SASH1 expressions. (4) The 2.0 μg of empty vector, wt-SASH1, D581V-SASH1, W594L-SASH1, F605S-SASH1 or V610E-SASH1 was transfected into HEK-293T cells alone, or together with 2.0 μg of HA-Tp53. Western blot was used to detect HA-Tp53 and endo-Tp53 expressions. Spearman correlation analysis was used to process immunohistochemical results of SASH1 and p53. Single-factor variance analysis was used to compare the expressions of p53 and SASH1. Pairwise comparison was performed using LSD-*t* method. **Results** In 134 cases of the human breast carcinoma tissue array, SASH1 expression was positively correlated with p53 expression ($r=0.319$, $P<0.001$). There were 4 cases of SASH1 (-), 42 (+), 67(++), 2(+++), 2(++++), and 82 cases of p53 (-), 36 (+), 10(++), 6(+++). With the increasing dose of transfected HA-Tp53, the expression levels of exogenous SASH1 (GFP-SASH1) and endogenous SASH1 (endo-SASH1) were increased ($F=205.369$, 178.238 , both $P<0.001$). With the increasing dose of transfected GFP-SASH1, HA-Tp53 mRNA and protein expressions were gradually increased ($F=67.481$, 506.538 , both $P<0.001$). Mutant SASH1 up-regulated endogenous and exogenous p53 expressions ($F=165.767$, 1136.930 , $P<0.001$); mutant p53 inhibited the expressions of endogenous and exogenous SASH1 ($F=57.142$, 354.517 , $P<0.001$). **Conclusion** SASH1 is positively correlated with p53, with a regulatory role in proliferation of breast cancer cells.

【Key words】 Breast neoplasms; p53 gene; SASH1 protein; human

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,约占女性肿瘤的30%。乳腺癌可由多种因素引起,其中遗传因素仅占所有乳腺癌的10%以下,主要是由易感基因BRCA1和BRCA2常染色体显性遗传引起的,其他90%左右的散发性乳腺癌确切因素至今尚不清楚^[1]。SASH1基因是SLY基因家族中的一员,由SAM和Src homology 3(SH3)两种结构域构成,在多种人体组织如乳腺、肺、甲状腺等中均有表达。Zeller等^[1]报道SASH1基因在乳腺癌细胞系和74%的乳腺癌组织中表达下调。Rimkus等^[2]发现SASH1基因在结肠癌Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期以及肝转移时表达显著减少。SASH1在骨肉瘤组织中低表达,而且,其在骨肉瘤细胞系MG-63中的过表达能够抑制骨肉瘤细胞的生长、增殖和侵袭^[3]。对转录调节因子p53的认识经历肿瘤抗原、癌基因、抑癌基因3个阶段^[4]。p53调节通路中包含许多应答基因,并通过p53调节的靶蛋白与其他信号通路相互作用。p53也可通过调节Rb-E2F-1、myc、Ras、IGF-1、cyclin

E-cdk2等基因活动,调节一系列正负反馈回路,与其他信号通路联合作用使之进入细胞周期^[5]。在本研究中,笔者通过免疫组织化学和免疫印迹等方法分析乳腺癌组织和细胞水平SASH1与p53的表达水平,探讨SASH1与p53的关系。

材料与方法

一、材料及试剂

大肠杆菌 *E. coli* Top 10(北京康为世纪生物有限公司),野生型PEGFP-C3质粒(来自全球科学家质粒共享非盈利组织Addgene)、HA-pcDNA3.0质粒(复旦大学生物医学研究院实验室馈赠)、HEK-293T细胞(中国科学院上海生命科学研究院典藏生物细胞库)。限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho* I)购自美国NEB生物公司、PrimeSTAR GXL DNA聚合酶(R050Q)购自日本TaKaRa生物科技有限公司,引物合成和测序由上海英骏生物公司广州分公

司完成,134 例乳腺癌组织芯片购自上海芯超生物科技公司(芯片编号:HBre-Duc150Sur-01)。

二、基因克隆与突变

以厦门大学韩家淮实验室惠赠的 p53 cDNA 作为模板,p53 全长引物和 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶 PCR 扩增 p53 全长基因序列。p53 基因克隆引物序列分别是:p53 正义链 5'-CGCGGATCCCCAC CACCATGGAGGAGCCGAGTCAGATCCTA-3'(插入 *Bam*H I 酶切位点),p53 反义链 5'-CCGCTCGAGT CAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACATGAGT TT-3'(插入 *Xho* I 酶切位点)。扩增条件:95 ℃ 2 min,95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ 恒温。

用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切质粒 HA-pcDNA3 和扩增的 p53 全长基因和 1% 琼脂糖凝胶电泳,按照北京天根生科科技有限公司试剂盒说明书进行纯化回收目的片段,按照 1:9 (p53 基因:HA-pcDNA3.0),用 DNA 连接酶(美国 NEB 生物科技公司)在 16 ℃ 连接 8~12 h,反应总体积为 20 μl。转化 *E. coli* TOP 10 感受态细菌,接种于平板,37 ℃ 培养过夜。挑取单克隆菌落,用北京康为世纪生物有限公司 2× Taq MasterMix 进行细菌溶液 PCR,筛选出阳性克隆,并少量抽提阳性菌液中质粒 HA-Tp53-pcDNA3.0 (HA-Tp53)。*Bam*HI、*Xho*I 双酶切鉴定并送公司测序验证插入序列的正确性。课题组前期构建好 SASH1-PEGFP-C3 (GFP-SASH1) 用于本研究中^[6]。

利用 Mutagenesis Primer 软件设计突变引物,引物序列见表 1,按照 KOD-Plus-Mutagenesis Kit(日本 Toyobo 公司)操作说明书使 SASH1 基因在 D581V、W594L、F605S、V610E 位点发生定点突变,以同样的方法使 p53 在 R175H、R248W、R273H 位点发生突变。转化 *E. coli* TOP10 感受态细菌,挑选单克隆菌落进行扩增并少量提取质粒,送公司测序。

三、实验分组

根据以上构建的重组和突变的质粒,设计的实验

分组如下。(1)p53 对外源性 SASH1 (GFP-SASH1) 和内源性 SASH1 (endo-SASH1) 表达的影响:0、0.5、1.0、2.0、4.0 μg 的 HA-Tp53 单独转染或分别与 2.0 μg 的 GFP-SASH1 共同转染至 HEK-293T 细胞。(2) GFP-SASH1 对 p53 表达的影响:0、0.5、1.0、2.0、4.0 μg 的 GFP-SASH1 剂量单独转染或分别与 2.0 μg 的 HA-Tp53 共同转染至 HEK-293T 细胞。(3) 突变型 p53 对 GFP-SASH1 和 endo-SASH1 表达的影响:2.0 μg 的 HA-pcDNA3.0 (空载体),野生型 p53 (wt-p53),突变型 R175H-p53、R248W-p53、R273H-p53 单独转染或分别与 2.0 μg 的 GFP-SASH1 共同转染至 HEK-293T 细胞;(4) 突变型 SASH1 对 HA-Tp53 和 endo-Tp53 表达的影响:2.0 μg 的空载体,野生型-SASH1 (wt-SASH1),突变型 D581V-SASH1、W594L-SASH1、F605S-SASH1、V610E-SASH1 单独转染或与 2.0 μg 的 HA-Tp53 共同转染 HEK-293T 细胞,另设未经处理的细胞为空白对照组。

四、细胞培养

HEK-293T 细胞分别于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养和传代。经 3 代传代后,待细胞长到合适的密度,根据不同实验设计,用自备的聚乙烯亚胺或 Lipofetamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司)将重组质粒野生型或突变型 GFP-SASH1 和野生型或突变型 Tp53 转染 HEK-293T 细胞。在转染 48~72 h 后,进行细胞裂解,并进行免疫印迹分析。

五、免疫印迹检测 p53 与 SASH1 蛋白表达

HEK-293T 细胞转染 HA-Tp53 与 GFP-SASH1 48 h 后,用 PBS 轻轻吹洗 3 遍,每 6 cm 培养皿加入 4 ml PBS,用细胞刮将培养皿中细胞刮落,将其转入 1.5 ml 离心管,转速 2 500 r/min,离心半径 8 cm,常温下离心 8 min,除去上清液,各培养皿细胞分别收集于 1 个微型离心管。用上海碧云天生物有限公司

表 1 p53 和 SASH1 定点突变用到的引物

突变位点	正向引物	反向引物
R175H-p53	5'-GGTGTGAGGCACTGCCCCACCATGA-3'	5'-TCATGGTGGGGCAGTCCTCACAACC-3'
R248W-p53	5'-CGGCATGAAGTGGAGGCCATCCTCAC-3'	5'-GTGAGGATGGCCCTCCAGTTTCATGCCG-3'
R273H-p53	5'-GCTTTGAGGTGCATGTTTGTGCTGTCTGG-3'	5'-CCAGGACAGGCACAAACATGCACCTCAAAAGC-3'
D581V-SASH1	5'-GCTCAAGAAAGAGTTATCATCGATATAATCAGCAAGCC-3'	5'-GGCTTGCTGATTATATCGATGATAACTCCTTTCTTGAGC-3'
W594L-SASH1	5'-CCATGGGGACCTTGATGGGCTGTGAACA-3'	5'-TGTTTACAGAGGCCATCAAGGTCCCCATGG-3'
F605S-SASH1	5'-CAAAGTCGGCAGTCCTCAAGTTCTATCTACGTGG-3'	5'-CCACGTAGATGAAGTTGGACGTGCCGACTTTG-3'
V610E-SASH1	5'-TCTACGTGGACGAGCTCAGTGAAGACGAGG-3'	5'-CCTCGTCTTCACTGAGCTCGTCCACGTAGA-3'

IP-WB 裂解液(含苯甲基磺酰氟)300 μ l,冰上裂解细胞 25 min,然后 12 000 r/min 离心半径 8 cm,4 $^{\circ}$ C 离心,15 min。吸取上清液,分别加入上样缓冲液(样品:缓冲液=10:1),于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min,冷却后即可进行电泳,转膜、封闭等免疫印迹步骤。免疫印迹中使用的第一抗体如下:anti-GFP、anti-HA、anti-GAPDH、anti- β tubulin (10B1) 小鼠抗人单克隆抗体(上海 Abmart 公司),anti-SASH1 兔抗人多克隆抗体(美国 Novus 生物科技公司)。

六、定量 RT-PCR 检测 p53 mRNA 表达

按照美国 Invitrogen 公司的 TRIzol 总 RNA 提取试剂说明书,提取总 RNA 并进行逆转录。逆转录以 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa)说明书步骤进行。p53 基因引物序列:正义链 5'-CCACCATCCACTACA ACTACAT-3',反义链 5'-TCCCAGCACAGGCACAAA-3',产物长度为 150 bp。内参照 GAPDH:正义链 5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3',反义链 5'-ACCACC CTGTTGCTGTAGCC-3',产物长度为 108 bp。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。用日本 TaKaRa 公司 SYBR[®] Premix DimerEraser[®](Perfect Real Time)定量 PCR 试剂,在 7500 Real-Time PCR System 分析仪上进行定量 PCR。结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算基因的表达量。

七、免疫组织化学检测乳腺癌组织中 p53 和 SASH1 蛋白表达

将人乳腺癌组织阵列芯片,用 SASH1 兔抗人多克隆抗体和 p53 抗体(福建迈新生物科技有限公司)进行免疫组织化学染色分析。组织切片脱水并阻断过内源性氧化合物酶等步骤,分别滴加第一抗体并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜。TBST (Tris-HCl 缓冲液+吐温 20)冲洗 3 次,持续 5 min,辣根过氧化物酶标记的通用第二抗体在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。切片用苏木素染色进行衬染,在显微镜下观察免疫组织化学染色强度,并拍摄照片获取图像。基于乳腺癌组织的 SASH1 染色强度,分为 5 个等级^[7]:(-)为阴性,(+)~(++++为阳性)。癌组织 p53 染色强度分为 4 个等级^[7]:(-)为阴性,(+)~(++)为阳性。

八、统计学分析

采用 SPSS19.0 统计学软件,用 Spearman 相关系数法对 SASH1 与 p53 免疫组织化学结果进行分析,采用单因素方差分析方法比较 SASH1 与 p53 表达量的差异,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,以 $P <$

0.050 表示差异有统计学意义。

结 果

一、乳腺癌组织中 SASH1 和 p53 蛋白表达的关系

SASH1 呈棕黄色,主要分布在细胞质。根据 134 例乳腺癌组织芯片 SASH1 染色强度,分为 5 个等级,其中 4 例(-)、42 例(+),67 例(++),20 例(+++),1 例(++++)。p53 呈棕黄色,主要分布和表达在细胞核。将 p53 染色强度分为 4 个等级:82 例(-),36 例(+),10 例(++),6 例(+++) (图 1)。结果提示:SASH1 表达水平与 p53 表达水平成正相关($r=0.319$, $P<0.001$) (表 2)。

二、p53 与 SASH1 相互诱导表达

1. p53 促进内源性和外源性 SASH1 的表达

在 HEK-293T 细胞中,随着 HA-Tp53 转染剂量的增大,外源性 SASH1 (GFP-SASH1) 的表达水平也在增高;同样地,HA-Tp53 也能促进内源性 SASH1 (endo-SASH1) 的表达(图 2,表 3)。

2. SASH1 诱导 p53 的表达

在 HEK-293T 细胞中,随着 GFP-SASH1 转染剂量的逐渐增大,HA-Tp53 mRNA 表达量逐渐增加;免疫印迹实验中,在转染剂量逐渐增加的 GFP-SASH1 作用下,HA-Tp53 的表达水平也逐渐增高(图 3,表 4)。

三、突变型 p53 使 SASH1 表达下调

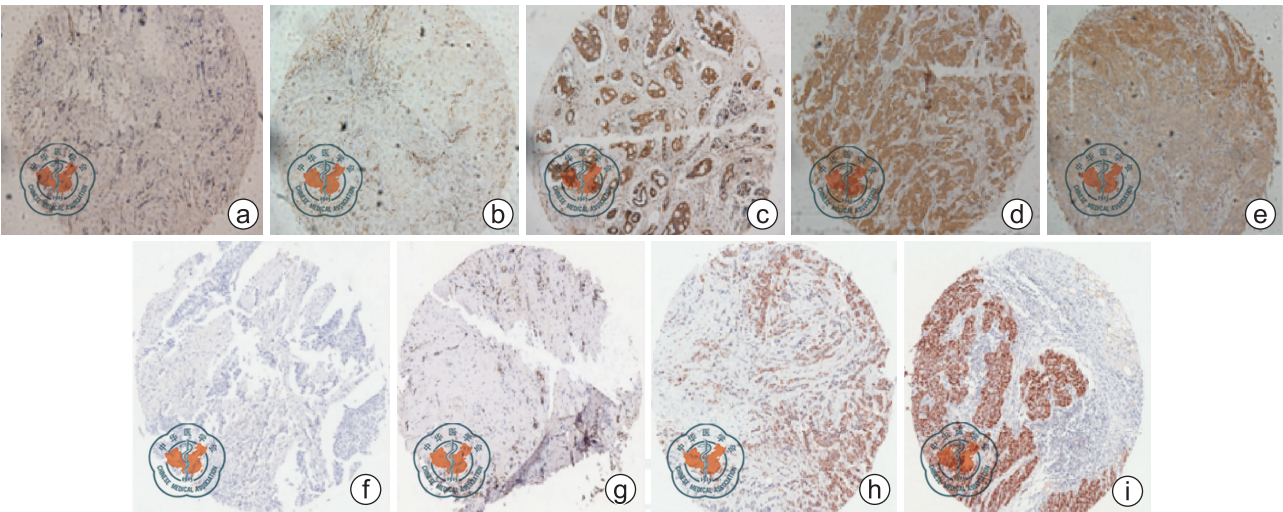
在 HEK-293T 细胞中,与空载体组相比,突变型 p53 使 GFP-SASH1 蛋白表达下调,突变型 p53 也能下调 endo-SASH1 蛋白的表达(图 4、表 5)。突变型 p53 可抑制 SASH1 的表达。

四、SASH1 突变诱导 p53 表达上调

在 HEK-293T 细胞中,与空载组相比,突变型 SASH1 使 HA-Tp53 表达上调,此外,突变型 SASH1 也可使 endo-Tp53 表达上调(图 5、表 6)。SASH1 突变后可促进 p53 的表达。

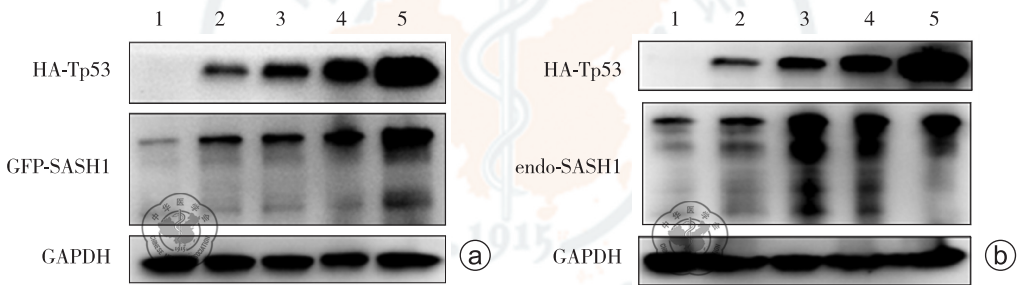
讨 论

p53 在癌症生物学的重要性是毋庸置疑的,但是这个转录因子在抑制肿瘤生长中所起的作用仍未被充分阐述,尤其在不同的肿瘤背景下,导致肿瘤抑制的 p53 靶基因仍不清楚,靶基因与 p53 之间的作用仍需进一步研究^[8]。Riley 等^[9]的研究揭示了 120 个参与 p53 通路的靶基因,且不同的靶基因与



注:a 图显示 SASH1(-);b 图显示 SASH1(+);c 图显示 SASH1(++);d 图显示 SASH1(+++);e 图显示 SASH1(++++) ;f 图显示 p53(-);g 图显示 p53(+);h 图显示 p53(++);i 图显示 p53(+++)

图 1 组织芯片上 134 例乳腺癌组织中 SASH1 与 p53 的表达(SP ×100)



注:a 图为 HA-Tp53 对 GFP-SASH1 表达的影响;b 图为 HA-Tp53 对 endo-SASH1 表达的影响。1 为空白对照组;2 为 0.5 μg 剂量组;3 为 1.0 μg 剂量组;4 为 2.0 μg 剂量组;5 为 4.0 μg 剂量组

图 2 Western blot 检测在 HEK-293T 细胞中不同 HA-Tp53 剂量对内源性和外源性 SASH1 表达的影响

表 2 134 例乳腺癌标本中 SASH1 与 p53 表达的关系(例)

p53	SASH1					合计
	-	+	++	+++	++++	
-	3	31	43	5	0	82
+	1	8	19	7	1	36
++	0	2	5	3	0	10
+++	0	1	0	5	0	6
合计	4	42	67	20	1	134

注: $r=0.319,P<0.001$

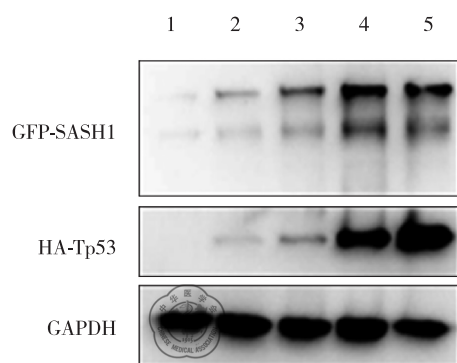
p53 存在不同的分子作用机制。Yang 等^[10] 论证了 p53 及以前未知的辐射反应蛋白(如 SASH1 蛋白)的磷酸化位点在辐射反应中的作用,推测 SASH1 与 p53 可能存在某种间接联系。既往研究表明,SASH1 的低表达促进了肿瘤细胞的增殖,多变量分析也证实 SASH1 可以作为患者存活率的一个独立的负性预后参数^[2]。

表 3 在 HEK-293T 细胞中不同剂量的 p53 对外源性和内源性 SASH1 表达的影响

组别	实验次数	GFP-SASH1	endo-SASH1
0 μg	3	0.005±0.002	0.830±0.147
0.5 μg	3	0.175±0.041 ^a	1.344±0.135 ^a
1.0 μg	3	0.563±0.049 ^a	4.833±0.130 ^{ab}
2.0 μg	3	1.472±0.101 ^{abc}	4.490±0.220 ^{ab}
4.0 μg	3	5.247±0.575 ^{abcd}	4.586±0.466 ^{ab}
F 值		205.369	178.238
P 值		<0.001	<0.001

注:^a与 0 μg 组比较, $P<0.050$;^b与 0.5 μg 组比较, $P<0.050$;^c与 1.0 μg 组比较, $P<0.050$;^d与 2.0 μg 组比较, $P<0.050$

基于研究结果,笔者推测 SASH1 作为 p53 调节通路的一个新的靶基因,参与促进乳腺癌增殖过程。免疫组织化学和免疫印迹实验结果显示,在组织水平和细胞水平上乳腺癌组织中 p53 的表达水平与 SASH1 表达水平变化一致,且 p53 促进 SASH1 表达



注:1为空白对照组;2为0.5 μg剂量组;3为1.0 μg剂量组;4为2.0 μg剂量组;5为4.0 μg剂量组

图3 Western blot 检测 HEK-293T 细胞中不同剂量 GFP-SASH1 对 HA-Tp53 表达的影响

表4 在 HEK-293T 细胞中不同剂量的 SASH1 对 HA-Tp53 mRNA 及蛋白表达的影响

组别	实验次数	HA-Tp53 mRNA	HA-Tp53 蛋白
0 μg	3	0.150±0.022	0.000±0.000
0.5 μg	3	0.462±0.082	0.373±0.033 ^a
1.0 μg	3	0.741±0.105 ^a	0.664±0.054 ^a
2.0 μg	3	1.876±0.200 ^{abc}	2.177±0.297 ^{abc}
4.0 μg	3	3.112±0.522 ^{abcd}	5.206±0.208 ^{abcd}
<i>F</i> 值		67.481	506.538
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

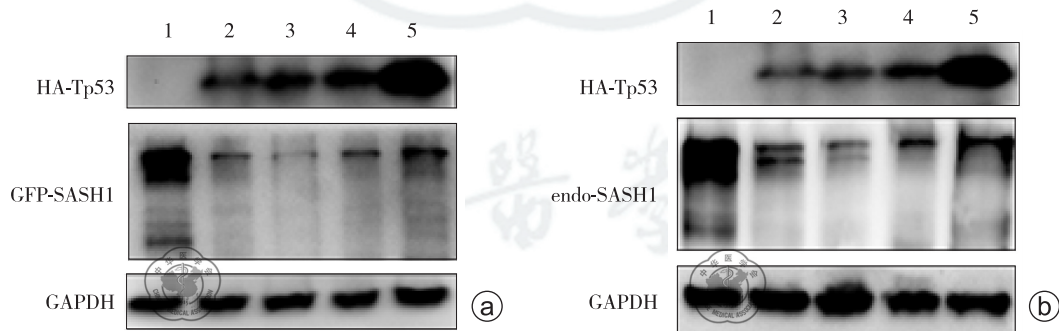
注:^a与0 μg组比较, $P<0.050$;^b与0.5 μg组比较, $P<0.050$;^c与1.0 μg组比较, $P<0.050$;^d与2.0 μg组比较, $P<0.050$

表5 在 HEK-293T 细胞中 p53 对内源性和外源性 SASH1 表达的影响

组别	实验次数	GFP-SASH1	endo-SASH1
空载体组	3	16.179±1.659	10.647±0.446
wt-p53 组	3	5.062±0.200 ^a	1.624±0.136 ^a
R175H-p53 组	3	2.105±0.123 ^{ab}	0.464±0.069 ^{ab}
R248W-p53 组	3	3.394±0.325 ^{ab}	0.818±0.078 ^{ab}
R273H-p53 组	3	4.258±0.109 ^{ac}	3.406±0.073 ^{abcd}
<i>F</i> 值		165.767	1136.930
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

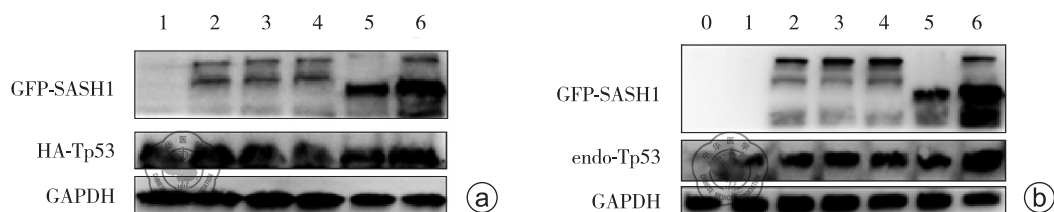
注:^a与空载体组比较, $P<0.050$;^b与 wt-p53 组比较, $P<0.050$;^c与 R175H-p53 组比较, $P<0.050$;^d与 R248W-p53 组比较, $P<0.050$

上调,这表明 SASH1 参与乳腺癌的发生,且与 p53 可能存在一定关系。基于 SASH1 蛋白的结构域特征,SASH1 可能在细胞内信号和转录调节中扮演重要角色^[11]。Martini 等^[12]发现 SASH1 与肌动蛋白细胞骨架相互作用并刺激细胞基质粘连。SASH1 在肿瘤中的作用机制可能也参与某些信号通路。在免疫印迹实验中,通过改变外源性 p53 的剂量来观察内源性 SASH1 的表达水平,结果发现,随着外源性 p53 转染剂量增加,SASH1 的表达水平也随之增加,表现出剂量依赖性。同时,改变外源性 SASH1 的转染剂量来观察外源性 p53 的表达水平,同样存在剂量依赖关系,qRT-PCR 结果也表现出相同趋势。这



注:a 图为 HA-Tp53 对 GFP-SASH1 表达的影响;b 图为 HA-Tp53 对 endo-SASH1 表达的影响。1 为空白载体;2 为 wt-p53;3 为 R175H-p53;4 为 R248W-p53;5 为 R273H-p53

图4 Western blot 检测 HEK-293T 细胞中突变型 p53 对 SASH1 表达的影响



注:a 图为 SASH1 对 HA-Tp53 表达的影响;b 图为 SASH1 对 endo-Tp53 表达的影响。0 为空白对照;1 为空白载体;2 为 wt-SASH1;3 为 D581V-SASH1;4 为 W594L-SASH1;5 为 F605S-SASH1;6 为 V610E-SASH1

图5 Western blot 检测 HEK-293T 细胞中 SASH1 对 HA-Tp53 及 endo-Tp53 表达的影响

表 6 在 HEK-293T 细胞中 SASH1 对 HA-Tp53 和 endo-Tp53 表达的影响

组别	实验次数	HA-Tp53	endo-Tp53
空白对照组	3		0.016±0.003
空载体组	3	1.130±0.036	0.257±0.037 ^a
wt-SASH1 组	3	2.141±0.099 ^b	0.373±0.007 ^{ab}
D581V-SASH1 组	3	3.081±0.326 ^{bc}	0.490±0.016 ^{bcd}
W594L-SASH1 组	3	2.693±0.150 ^{bc}	0.670±0.021 ^{abcd}
F605S-SASH1 组	3	3.829±0.061b ^{cde}	0.710±0.024 ^{abcd}
V610E-SASH1 组	3	3.510±0.402 ^{bcd}	1.477±0.101 ^{abedef}
<i>F</i> 值		57.142	354.517
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:^a 与空白对照组比较, $P<0.050$;^b 与空载体组比较, $P<0.050$;^c 与 wt-SASH1 组比较, $P<0.050$;^d 与 D581V-SASH1 组比较, $P<0.050$;^e 与 W594L-SASH1 组比较, $P<0.050$;^f 与 F605S-SASH1 组比较, $P<0.050$

一结果与免疫组织化学结果相符,进一步证实 p53 与 SASH1 存在相互诱导表达的现象。

p53 作为抑癌基因,对细胞应激信号作出反应,启动细胞周期停滞、凋亡、老化以保护基因的完整性^[13]。在人类肿瘤中,p53 发生突变的概率有 50%,且许多突变型 p53 产生癌基因的功能,例如肿瘤细胞增殖、存活、转移以及产生对野生型 p53 的负调节^[14]。本实验中,在细胞水平,突变型 p53 与过表达的野生型 p53 对内源性和外源性 SASH1 的表达有抑制作用。另一方面,突变型与野生型 SASH1 使内源性及外源性 p53 表达上调。p53 基因的突变是许多肿瘤增殖的始动因素,而本实验中观察到突变型 p53 抑制 SASH1 的表达,p53 与 SASH1 之间相互影响,使 SASH1 表达下调,从而在乳腺癌的发生发展过程中起重要作用。p53 在肿瘤发生和进展过程中所扮演的关键角色,使 p53 成为抗肿瘤药物设计的重要靶点^[15]。目前治疗肿瘤的方法在于增强体外野生型 p53 的功能或使突变型 p53 恢复野生型 p53 的功能^[16]。本研究证实了乳腺癌中 p53 与 SASH1 的表达存在相关性及相互作用,为不断完善 p53 信号通路在肿瘤发生发展过程中的重要作用及临床治疗肿瘤提供新的线索。

参 考 文 献

- [1] Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, et al. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(19): 2972-2983.
- [2] Rimkus C, Martini M, Friederichs J, et al. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(10): 1419-1423.
- [3] Meng Q, Zheng M, Liu H, et al. SASH1 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(1-2): 201-210.
- [4] Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene [J]. *Cell*, 2004, 116(2 Suppl): S67-S69.
- [5] Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops [J]. *Oncogene*, 2005, 24(17): 2899-2908.
- [6] 王晶,贺勇,张继旺,等. SASH1 通过 MAP2K2 和 MAP4K4 与 ERK 信号通路交互作用 [J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(11): 1530-1536.
- [7] Li L, Wang M, Yu G, et al. Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(6): dju083.
- [8] Allen MA, Andrysik Z, Dengler VL, et al. Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms [J]. *Elife*, 2014, 3: e02200.
- [9] Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5): 402-412.
- [10] Yang F, Waters KM, Miller JH, et al. Phosphoproteomics profiling of human skin fibroblast cells reveals pathways and proteins affected by low doses of ionizing radiation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14152.
- [11] Chen EG, Chen Y, Dong LL, et al. Effects of SASH1 on lung cancer cell proliferation, apoptosis, and invasion in vitro [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1393-1401.
- [12] Martini M, Gnann A, Scheikl D, et al. The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(11): 1630-1640.
- [13] Meng X, Franklin DA, Dong J, et al. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(24): 7161-7167.
- [14] Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3): 304-317.
- [15] Wang Z, Sun Y. Targeting p53 for novel anticancer therapy [J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(1): 1-12.
- [16] Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 656-660.

(收稿日期:2016-04-05)

(本文编辑:刘军兰)

邱中淑,王萍,罗黄超,等. SASH1 通过 p53 信号通路调节乳腺癌细胞增殖[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2016, 10(5): 269-275.