

## 癌基因*iASPP-SV*参与乳腺癌的形成

董一楠, 孔凡铭, 张新伟, 魏 枫, 孙 倩

天津医科大学肿瘤医院研究所免疫研究室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室, 天津 300060

**[摘要]** 背景与目的: p53凋亡刺激蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53, iASPP)属于ASPP家族成员, 其与p53结合, 抑制p53靶基因的转录活性, 抑制细胞凋亡, 与肿瘤形成相关。先前该研究所在课题组发现了iASPP的一个新亚型iASPP剪切变异体(iASPP splice variant, iASPP-SV), 其是包含407个氨基酸残基的核蛋白, 能与p53结合、抑制p53的转录活性, 但是其与乳腺癌细胞增殖的作用还不清楚。因此, 该研究旨在探讨iASPP-SV在乳腺癌发生、发展中的作用。**方法:** 用5'-基因末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)方法检测乳腺癌细胞系MCF-7的iASPP-SV mRNA的5'末端序列。将pFLAG-iASPP-SV和pFLAG-iASPP(828)分别转染HEK 293细胞, 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测HEK293细胞及8种人类肿瘤细胞iASPP-SV的表达情况。建立稳定表达FLAG-iASPP-SV和FLAG-iASPP(828)的NIH 3T3细胞系, 细胞增殖分析、克隆形成实验和软琼脂集落形成实验检测iASPP-SV、iASPP(828)是否促进细胞增殖、是否是癌基因。用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reactive, RTFQ-PCR)的方法检测原发性乳腺癌iASPP-SV和iASPP(828) mRNA表达水平, 确定人乳腺癌中iASPP-SV是否上调。用荧光素酶报告基因实验检测iASPP-SV、iASPP(828)、p53与NF- $\kappa$ B/p65的关系。**结果:** 5'-RACE方法显示, MCF-7细胞中的iASPP-SV由RAI序列(DQ986418.1)编码。Western blot实验显示, 多种人类肿瘤细胞系表达内源性iASPP-SV。细胞增殖分析、克隆形成实验和软琼脂集落形成实验证实iASPP-SV与iASPP(828)能促进肿瘤细胞增殖, 是癌基因。RTFQ-PCR实验显示, p53野生型乳腺癌组织iASPP-SV表达水平的中位值比p53突变型显著升高。荧光素酶报告基因实验证实iASPP-SV、iASPP(828)能抑制NF- $\kappa$ B/p65转录, 因此iASPP可能是双功能蛋白。**结论:** iASPP-SV可能作为乳腺癌治疗的有效靶点。

**[关键词]** p53凋亡刺激蛋白抑制剂; p53凋亡刺激蛋白抑制剂剪切变异体; p53; NF- $\kappa$ B; 乳腺癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.10.005

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)10-0831-09

***iASPP-SV*, as an oncogene, participates in breast tumorigenesis and progression** DONG Yinan, KONG Fanming, ZHANG Xinwei, WEI Feng, SUN Qian (Cell Immunology Lab, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of "Cancer Prevention", Tianjin Key Laboratory of Immunology and Cancer Biotherapy, Tianjin 300060, China)

Correspondence to: ZHANG Xinwei E-mail: zhangxinwei@tjmuch.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) is one of the ASPP family. It binds to p53 to inhibit the transcriptional activity of p53-target genes and cell apoptosis, which is associated with tumor formation. Previously, we found a new subtype of iASPP, iASPP splice variant (iASPP-SV), which is a nuclear protein containing 407 amino acid residues and can bind to p53, inhibiting p53 transcriptional activity. However, the relationship of iASPP-SV and breast cancer is still obscure. Therefore, the purpose of this research was to study the role of iASPP-SV on breast cancer tumorigenesis and progression. **Methods:** 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) was used to identify the 5'-end of iASPP-SV mRNA in MCF-7 cells. HEK 293 cells were transfected with pFLAG-iASPP-SV and pFLAG-iASPP (828). Then Western blot was used to identify whether endogenous iASPP-SV was expressed in HEK 293 cells and 8 types of human tumor cell lines. This study established the stable clones of

NIH 3T3 expressing FLAG-iASPP-SV and FLAG-iASPP (828). Cell proliferation assay, colony formation and soft agar colony formation assay were used to identify whether iASPP-SV and iASPP (828) can promote cell proliferation and iASPP-SV is an oncogene. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reactive (RTFQ-PCR) was used to detect the levels of iASPP-SV and iASPP (828) mRNA in primary breast cancers. Luciferase assays were used to identify the relationships between iASPP-SV, iASPP (828), p53 and NF- $\kappa$ B p65. **Results:** The study identified that iASPP-SV was encoded by previously reported NF- $\kappa$ B p65 subunit (RelA)-associated inhibitor (RAI), and endogenously expressed in many human cancer cell lines. Analysis of cell proliferation, colony formation assay and soft agar assay for colony formation identified that similarly to iASPP (828), iASPP-SV promoted tumor cell proliferation and acted as an oncogene. RTFQ-PCR result showed that the median values of iASPP-SV and iASPP (828) in breast cancers with wild-type p53 were more significantly over-expressed than those of mutant p53. Luciferase assays showed that iASPP-SV and iASPP (828) could suppress NF- $\kappa$ B p65 transcriptional activity. Thus iASPP family may participate in the regulation of p53 and NF- $\kappa$ B activity, which imply that iASPP perhaps shows pro- or anti-survival activities when it interacts with different proteins. **Conclusion:** These findings indicate that iASPP-SV may be a potential target for breast cancer therapy.

[ **Key words** ] Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53; Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 splice variant; p53; NF- $\kappa$ B; Breast cancer

p53由*TP53*基因编码, 位于细胞核, 是重要的肿瘤抑制因子, 其重要的功能是通过诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤形成<sup>[1-2]</sup>。在正常情况下, p53低表达, 并且与MDM2相互作用, 处于失活状态<sup>[1]</sup>。当细胞受到基因毒性或毒性应激如DNA损伤时, p53激活并且特定残基磷酸化来保持其稳定性, 抑制自我降解, p53水平上调<sup>[1,3]</sup>。p53是转录因子, 其激活后能结合并活化具有促进细胞凋亡和细胞生长停滞作用的靶基因如*p21<sup>CDKN1A</sup>*和*MDM2*, 导致细胞生长抑制或凋亡、损伤细胞自我修复或清除, 阻止正常细胞恶性转化<sup>[1,3-4]</sup>。有研究表明, p53突变或缺失与人类大多数种类的肿瘤细胞相关<sup>[1]</sup>。

p53凋亡刺激蛋白(apoptosis-stimulating protein of p53, ASPP)家族包括ASPP1、ASPP2和ASPP抑制剂(inhibitor of ASPP, iASPP)。ASPP1和ASPP2增强p53的促凋亡活性, 而iASPP通过与p53结合, 抑制p53靶基因的转录活性, 抑制细胞凋亡<sup>[2,5]</sup>。更重要的是, iASPP和p53形成了负反馈环, p53的积累和活化能直接促进iASPP蛋白表达。iASPP的C端与ASPP1和ASPP2的C端相同, 并且iASPP能和ASPP1、ASPP2竞争与p53的结合<sup>[6]</sup>。iASPP位于染色体19q13.3上, 由人类*PPP1R13L*基因编码<sup>[5]</sup>。iASPP在多个恶性肿瘤如白血病、胃癌中表达上

调, iASPP过表达导致p53失去抑制肿瘤形成的功能, 并且在肿瘤细胞系中RNAi抑制iASPP能恢复p53的凋亡活性<sup>[2,5,7]</sup>。研究表明, iASPP基因多态性与乳腺癌、肺癌相关。并且, iASPP过表达与宫颈鳞状细胞癌预后差相关, iASPP高表达卵巢癌和宫颈癌患者无病生存期(disease-free survival, DFS)和总生存期(overall survival, OS)短<sup>[8-9]</sup>。抑制iASPP能促进p53依赖的凋亡, 触发肿瘤细胞死亡, 抑制肿瘤细胞增殖, 增强肿瘤对化疗敏感性<sup>[5,8]</sup>。先前我们发现了iASPP的一个新亚型iASPP剪切变异体(iASPP splice variant, iASPP-SV), 其是包含407个氨基酸残基的核蛋白, 能与p53结合、抑制p53的转录活性<sup>[10]</sup>。因此, *iASPP*基因至少转录iASPP(828)和iASPP-SV两个亚型<sup>[10-11]</sup>。但是迄今为止, 这些亚型的联系尚不完全清楚。本研究旨在探讨iASPP-SV在乳腺癌中的表达水平, 及其在乳腺癌肿瘤形成和进展中的作用, 为乳腺癌的治疗提供新的思路和靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞系及原发性乳腺癌组织

乳腺癌细胞系MCF-7和MDA-MB-231, 肿瘤细胞系A549、HCT116、HuH1、Mino、Jeko-1和Ramos, 以及NIH 3T3细胞系由美

国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC)提供, 培养于含有10%胎牛血清的培养基(Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)中。所有原发性乳腺癌均经知情同意后在手术后收集, 并且此研究通过了天津医科大学肿瘤医院及癌症研究所人体试验委员会批准。HEK293细胞由天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所免疫研究室提供, HKE293细胞常规培养于含10%灭活胎牛血清的DMEM中。

## 1.2 引物和抗体

用于实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reactive, RTFQ-PCR)的引物包括GAPDH(Forward 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3', Reverse 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3')、iASPP-SV(Forward 5'-TGTGCTGGTTGTATGCCC TGGAAAG-3', Reverse 5'-AGCCGGAACAA GAGCCCATCAGA-3')和iASPP(828) (Forward 5'-TCTCCTCTGGCCAGCGACCG-3', Reverse 5'-CTGCGAGGCAAAGTGCCCGA-3'); 用于iASPP-SV 5'-RACE的引物包括: GSP1 5'-AGCCGGAACAAGAGCCCATCA-3'和GSP2 5'-ACTCCCTCTCCACAACCTTCCAGG-3'; 用于PCR的引物包括iASPP(828)5'-CGTAGAATTC CATGGACAGCGAGGCATTCCAGAGC-3'; 用于反义质粒合成的引物包括iASPP-SV(Forward 5'-AATTAAGAGCCCATCAGAGGACAGGTCC CCAGGAGACACCCAACACTCCCTCTC-3', Reverse 5'-TCGAGAGAGGGAGTGTGGGTG TCTCCTGGGGACCTGTCTCTGATGGGCTC TT-3')、iASPP(828) (Forward 5'-AATTAGCAG GGAGCTCCCGAAGGCGGACGCTGGCGCGT CGTAGGCTGTGGC-3', Reverse 5'-TCGAGC CACAGCCTACGACGCGCCAGCGTCCGCCT TCGGGAGCTCCCTGCT-3')和iASPP(common) (Forward 5'-AATTCGGTCAGCGCCGCGTCC AGGAGGAGCACCCAGAGGGTTGAGGCG-3', Reverse 5'-TCGACGCCTCAACCCTCTGGTGC TCCTCCTGGACGCGGCGCTGACCGG-3')。

所用抗体包括iASPP羊抗人单克隆抗体(sc-74941, 购自美国Santa Cruz公司)、 $\beta$ -actin鼠抗人单克隆抗体(A1978, 购自美国Sigma公司)和FLAG鼠抗人单克隆抗体(F3165, 购自美国Sigma公司)。

## 1.3 质粒构建

构建FLAG-iASPP(828)质粒: 质粒PCMV-iASPP(SC318309, 购自美国OriGene公司)通过PCR扩增, 并且把PCR产物与载体pGEM-T连接, 之后用EcoR I和Xho I双酶切亚克隆到FLAG1-pcDNA3。构建FLAG-iASPP-SV质粒: 按说明书用TRIzol试剂(购自美国Invitrogen公司)提取细胞总RNA, 并测定RNA纯度和浓度。2  $\mu$ g总RNA用随机引物进行反转录。设计特异性引物(正义序列: 5'-GGAATTCCAT GTGCTGGTTGTATGCC-3', 反义序列: 5'-CTCGAGGTCAGCCTCAGAAACCTC-3')用于扩增iASPP/RAI (AF078037)的774~2 028片段。总反应体系为50  $\mu$ L, 包括2  $\mu$ L cDNA、2.5 U La Taq(Takara)和25  $\mu$ L 2 $\times$ GC Buffer I。PCR反应条件: 预变性94  $^{\circ}$ C, 5 min; 变性94  $^{\circ}$ C, 45 s; 退火50  $^{\circ}$ C, 45 s; 延长72  $^{\circ}$ C, 90 s; 6个循环。之后在7500型RTFQ-PCR仪系统上按照标准程序进行PCR: 94  $^{\circ}$ C, 45 s; 56  $^{\circ}$ C, 45 s; 72  $^{\circ}$ C, 90 s; 30个循环。PCR产物与载体pGEM-T连接, 之后用EcoR I和Xho I双酶切亚克隆到FLAG1-pcDNA3。构建反义质粒, 设计针对iASPP-SV/iASPP(828)反义寡核苷酸对, 与pcDNA3连接。所有质粒经过测序验证。

## 1.4 cDNA 5'-末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)

购买5'-RACE kit试剂盒(18374-058, 购自美国Invitrogen公司)。按说明书用TRIzol试剂提取MCF-7细胞总RNA, 并测定RNA纯度和浓度。用特异性iASPP-SV引物GSP1反转录总RNA, 之后在dCTP存在下用末端脱氧核糖核酸转移酶延长。按照说明书用5'-RACE锚定加尾引物和iASPP-SV引物GSP2来扩增cDNA。PCR产物连接到pGEM-T Vector(A3600, 购自美国Promega公司), 之后进行测序。

### 1.5 RTFQ-PCR分析

用TRIzol(购自美国Invitrogen公司)试剂提取细胞总RNA, DNA用TURBO DNA-free™(购自美国Applied Biosystems公司)去除。1 μg RNA用iScript cDNA合成试剂盒(购自美国BioRad公司)反转录合成cDNA。按照商家说明书进行RTFQ-PCR。特异性*iASPP* mRNA相对量由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 呈现。在原发性乳腺癌中,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  *p53*野生型乳腺癌组织 -  $\Delta Ct$  *p53*突变型乳腺癌组织。

### 1.6 检测*p53*基因突变

设计一对特异性引物(正义序列: 5-TGCATTCTGGGACAGCCAAG-3, 反义序列: 5-AACATCTCGAAGCGCTCACG-3)来扩增*p53*外显子4~11的一个682 bp的片段。在包含10 μL cDNA和2.5 U pyrobest DNA polymerase [购自宝生物工程(大连)有限公司]的100 μL体系中, PCR扩增*p53*片段。为避免RTFQ-PCR期间出现错误的突变, 在突变样本中, 重复RTFQ-PCR并测序。

### 1.7 转染

在6孔板中每孔3 mL完全培养液, 铺 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞。12~24 h后, 用Lipofectamine™2000(购自美国Invitrogen公司)转染2 μg FLAG-*iASPP*(828)或FLAG-*iASPP-SV*质粒。为了建立稳定表达FLAG-*iASPP-SV*和FLAG-*iASPP*(828)的NIH 3T3细胞系, 转染后的细胞用500 mg/mL G418筛选稳定表达细胞系2~4周, 并通过有限稀释法挑单细胞克隆。

### 1.8 细胞增殖分析

在96孔板中每孔铺 $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$ 个细胞, 每孔加入10 μL Cell Counting Kit-8 (购自日本同仁化学研究所)溶液, 在细胞培养箱内继续温育1 h。按照说明书, 不同时间点在450 nm处测定吸光度值。

### 1.9 克隆形成实验

取对数生长期 $1 \times 10^3$ 个细胞铺到10 cm的平板中, 在37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的温箱中培养10 d。培养结束后, 用0.5%结晶紫染色并用倒置显微镜计数细胞数目大于40个的克隆数目。

### 1.10 软琼脂集落形成试验

$2 \times 10^3$ 个细胞与含0.35%琼脂糖的0.4 mL培养液混匀, 接种到12孔板, 每孔0.8 mL含0.7%相同介质的固化琼脂糖。在37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的温箱中温育3周后, 用倒置显微镜计数细胞数目大于40个的克隆数目。

### 1.11 蛋白[质]印迹法(Western blot)实验

收集细胞, 用细胞裂解液RIPA裂解细胞、提取总蛋白, 测定浓度。SDS-PAGE凝胶电泳分离, 电转移至PVDF印迹膜, 封闭, 分别滴加以1:1 000稀释的*iASPP*羊抗人单克隆抗体(sc-74941, 购自美国Santa Cruz公司)及FLAG鼠抗人单克隆抗体(F3165, 购自美国Sigma公司)进行温育, PBST洗膜后, 加入二抗室温温育, PBST洗膜后用化学发光法显影。

### 1.12 荧光素酶报告基因实验

转染前24 h消化HEK293细胞并计数, 在24孔板中每孔接种 $5 \times 10^4$ 个细胞, 待细胞达到60%~70%融合度时, 采用Lipofectamine™2000试剂, 将pFLAG-*iASPP*(828)、pFLAG-*iASPP-SV*和pFLAG-P53分别与pFLAG-P65、200 ng 荧光素酶报告基因和30 ng pCMV-β-半乳糖苷酶共转染HEK293细胞, 设3个复孔。转染后24 h, 使用荧光素酶检测系统(购自美国Promega公司)测定荧光素酶相对活性, 按照Luciferase®Reporter Assay System说明书进行操作。

### 1.13 统计学处理

用SPSS 11.0软件分析实验数据。对数据不符合参数检验条件, 采用配对样本的非参数秩和检验, 均数比较采用独立样本*t*检验, 各组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 *iASPP-SV* mRNA的5'末端序列

*iASPP-SV*和*iASPP*(828)的区别在于N末端不同, 我们首先用5'-RACE克隆MCF-7细胞的*iASPP-SV* mRNA的5'末端, 并测序。

5'-RACE产物序列分析结果见图1。美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)提供的生物序列的同源性搜索数据显示:iASPP-SV的5'末端

与RAI(AF078037.1)几乎相同。这表明iASPP-SV和iASPP(828)是由同一个基因转录,iASPP-SV由RAI序列(DQ986418.1)编码。

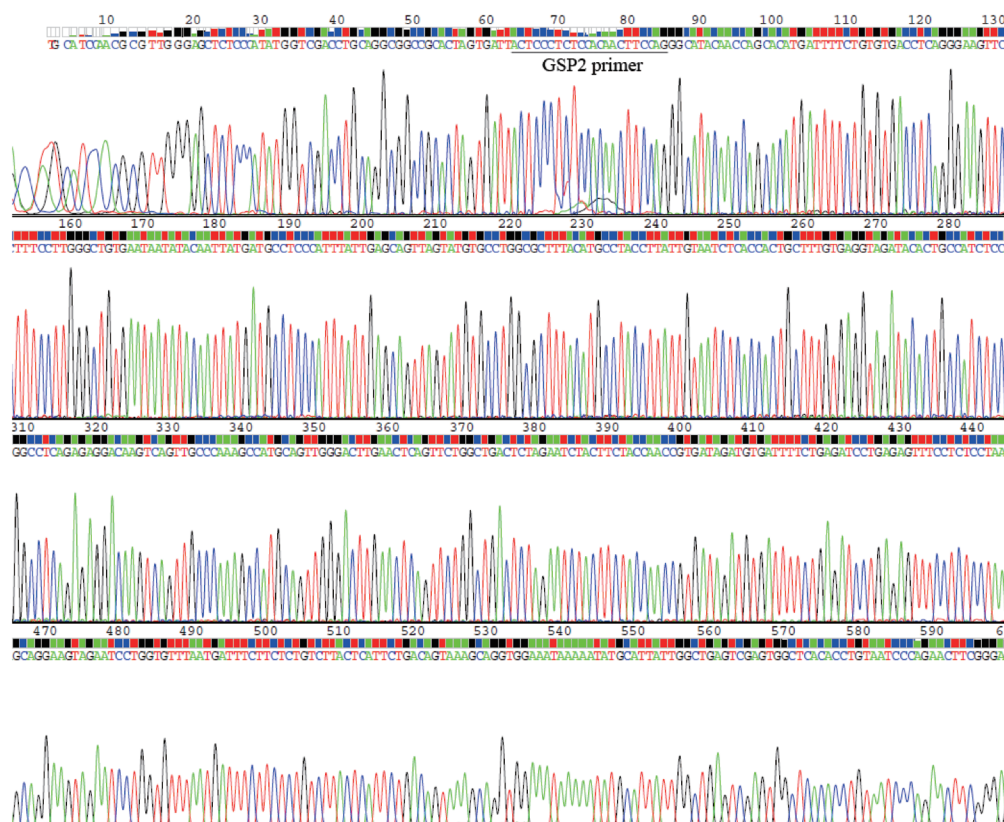


图1 5'-RACE克隆iASPP-SV的DNA产物测序

Fig. 1 5'-RACE products of iASPP-SV were confirmed by DNA sequencing

## 2.2 多种肿瘤细胞系表达内源性iASPP-SV

为了确定是否人类肿瘤细胞表达内源性iASPP-SV,我们分别克隆iASPP(828)及iASPP-SV并插入到FLAG tag质粒中(图2)。将pFLAG-iASPP-SV和pFLAG-iASPP(828)分别转染HEK293细胞。转染后的HEK293细胞抗iASPP(828)和抗iASPP-SV抗体两个条带大约 $105 \times 10^3$ 和 $55 \times 10^3$ ,并且这两个条带在8种肿瘤细胞中都存在(图3)。为了确定这两个条带是否是iASPP(828)和iASPP-SV,我们分别转染iASPP-SV和iASPP(828)的反义质粒到MCF-7细胞。 $55 \times 10^3$ 和 $105 \times 10^3$ 蛋白明显减少,同时iASPP-SV和iASPP(828) mRNA也减少(图4)。上述结果表明, $55 \times 10^3$ 的条带是iASPP-SV,并且人类多种肿瘤细胞系表达内源性iASPP-SV。

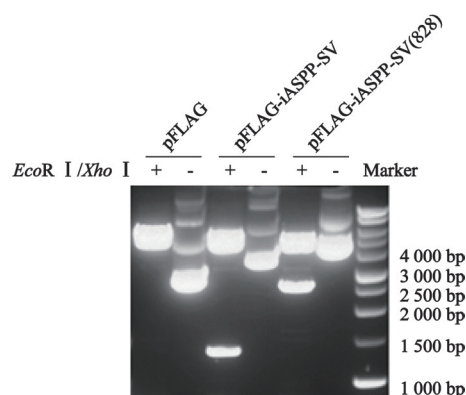


图2 Western blot实验验证构建的pFLAG-iASPP-SV和pFLAG-iASPP(828)质粒

Fig. 2 Western blot detected the constructed plasmids pFLAG-iASPP-SV and pFLAG-iASPP(828)

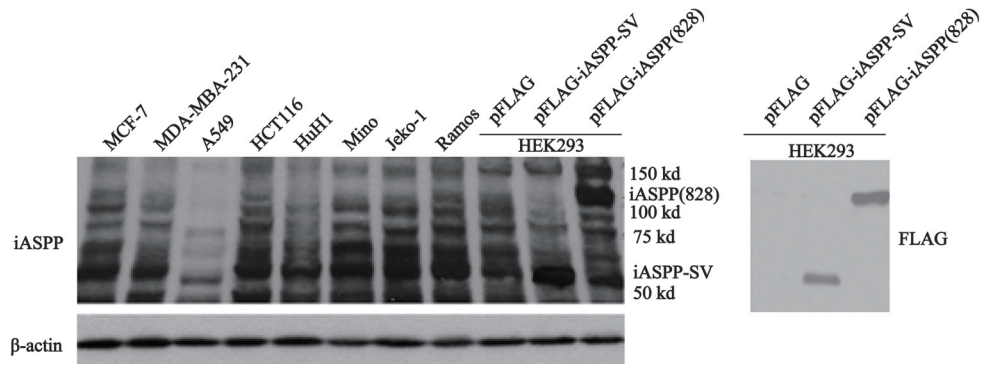


图3 Western blot实验检测人类肿瘤细胞系中*iASPP*(828)和*iASPP-SV*的表达水平

Fig. 3 Western blot detected the expression levels of *iASPP*(828) and *iASPP-SV* in several human tumor cell lines

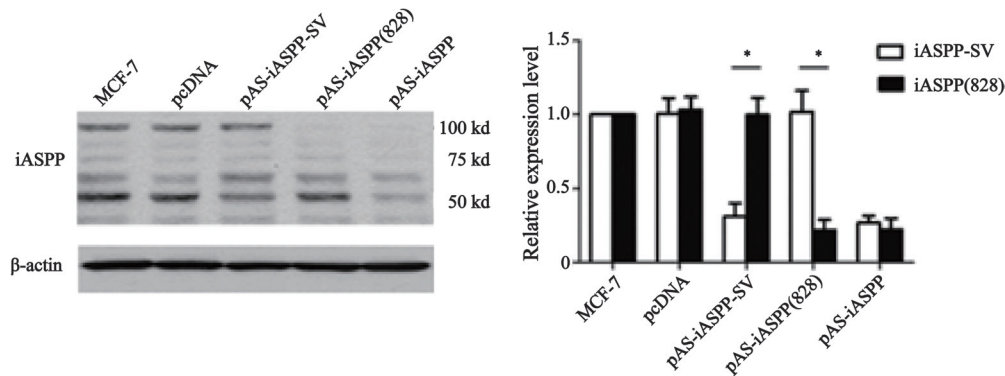


图4 Western blot实验检测转染*iASPP-SV*和*iASPP*(828)的反义质粒后*iASPP*(828)和*iASPP-SV*表达水平, PTFQ-PCR检测*iASPP-SV*和*iASPP*(828) mRNA水平

Fig. 4 Western blot (left figure) and RTFQ-PCR analysis (right figure) demonstrated that plasmids of antisense *iASPP-SV* suppressed endogenous *iASPP-SV* expression in MCF-7

\*:  $P < 0.05$

### 2.3 *iASPP-SV*促进肿瘤细胞NIH 3T3增殖

我们首先建立了稳定表达FLAG-*iASPP-SV*和FLAG-*iASPP*(828)、能在500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 遗传霉素中生长的NIH 3T3克隆(图5)。细胞增殖分析结果显示, *iASPP-SV*和*iASPP*(828)促进NIH 3T3细胞生长(图6), 并且克隆形成和软琼脂集落形成实验表明*iASPP-SV*比*iASPP*(828)的致癌活性更强(图7)。

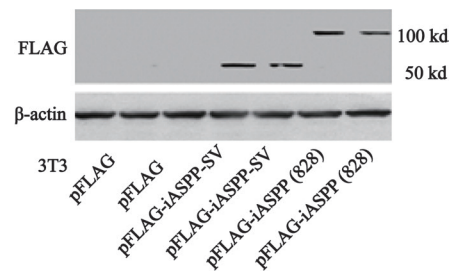


图5 Western blot实验验证构建的稳定表达FLAG-*iASPP-SV*和FLAG-*iASPP*(828)的NIH 3T3细胞系

Fig. 5 Western blot detected the stable clones of NIH 3T3 expressing FLAG-*iASPP-SV* and FLAG-*iASPP*(828)

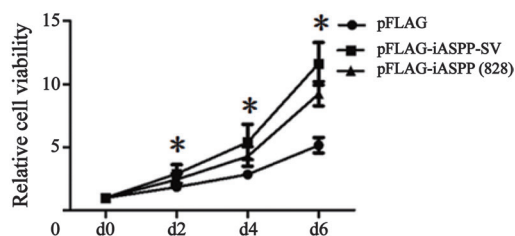


图6 用细胞计数试剂盒检测稳定表达FLAG-iASPP-SV和FLAG-iASPP(828)的NIH 3T3细胞系第0、2、4和6天的细胞增殖情况

Fig. 6 Cell proliferation of NIH 3T3 expressing FLAG-iASPP-SV and FLAG-iASPP(828) was assayed with cell counting kit-8 assay on d 0, 2, 4 and 6

\*:  $P < 0.05$

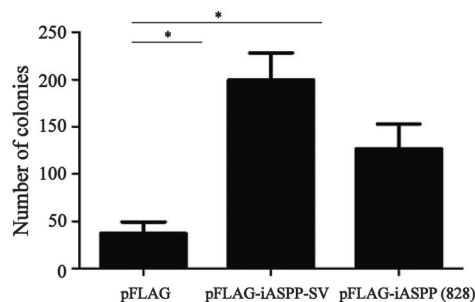
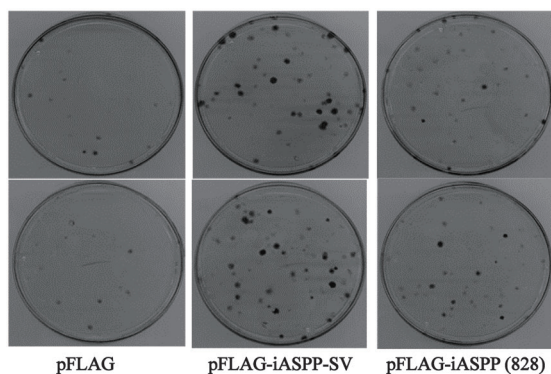


图7 克隆形成和软琼脂集落形成实验检测稳定表达FLAG-iASPP-SV和FLAG-iASPP(828)的NIH 3T3细胞系细胞的克隆形成及集落形成能力

Fig. 7 Colony formation and soft agar colony formation assay were used to detect the clone formation and colony formation ability of NIH 3T3 expressing FLAG-iASPP-SV and FLAG-iASPP(828)

\*:  $P < 0.05$

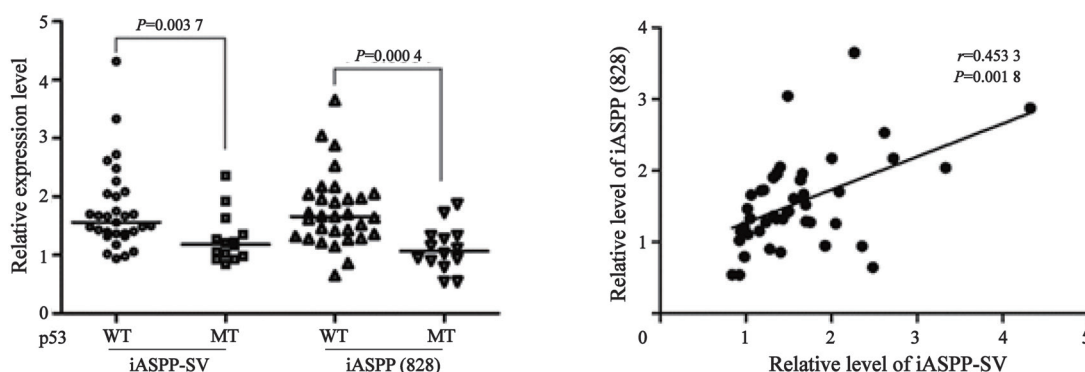


图8 RTFQ-PCR实验检测原发性乳腺癌iASPP-SV和iASPP(828) mRNA表达水平

Fig. 8 RTFQ-PCR detected the levels of iASPP-SV and iASPP(828) mRNA in primary breast cancer

## 2.4 iASPP-SV在p53野生型乳腺癌表达上调

应用RTFQ-PCR的方法检测原发性乳腺癌组织iASPP-SV和iASPP(828)mRNA表达水平。结果表明, p53野生型乳腺癌组织iASPP-SV和iASPP(828)表达水平的中位值比p53突变型显著升高, 并且iASPP-SV表达水平与iASPP(828)呈正相关(图8)。

## 2.5 iASPP-SV抑制NF-κB/p65的转录活性

应用荧光素酶报告基因实验检测iASPP(828)和iASPP-SV与NF-κB/p65的关系。结果表明, p53、iASPP(828)和iASPP-SV都能与NF-κB/p65结合并抑制其转录活性(图9)。

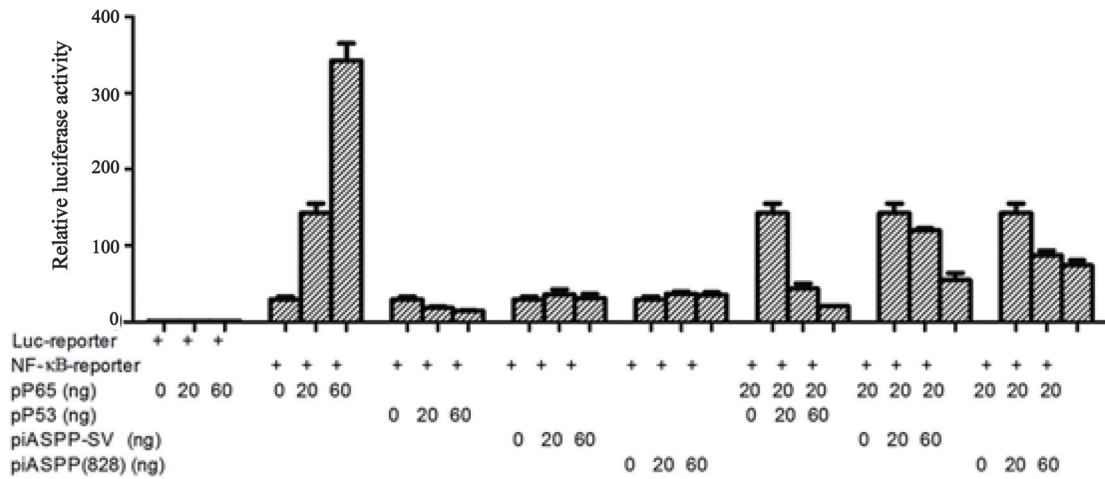


图9 荧光素酶报告基因实验检测p53、iASPP(828)和iASPP-SV与NF-κB/p65的关系

Fig. 9 Luciferase assays were used to identify the relationship between iASPP-SV, iASPP(828) and p53 and NF-κB/p65

When NF-κBp65 was co-transfected with pFLAG-iASPP-SV, pFLAG-iASPP(828) and pFLAG-p53 respectively, the transcriptional activity of luciferase reporter gene decreased, indicating that p53, iASPP(828) and iASPP-SV bind to NF-κB/p65 and inhibit its expression

### 3 讨 论

乳腺癌是全世界女性中最常见的恶性肿瘤, 严重危害女性健康。我国华东地区乳腺癌的发病比例占中国人口的38%, 近些年其发病率有明显上升趋势, 引起国内外学者的关注<sup>[12]</sup>。iASPP是ASPP家族中的抑制性成员, 能特异性抑制p53的促凋亡作用。iASPP基因通过选择性剪接作用至少转录iASPP(828)和iASPP-SV两个亚型<sup>[10-11]</sup>, 并且iASPP在多个恶性肿瘤中表达上调, 与肿瘤预后不良相关<sup>[2,5,7-8]</sup>。

在本研究中, 我们用5'-RACE检测了MCF-7细胞中iASPP-SV mRNA的5'末端序列, 并且生物序列的同源性搜索显示, iASPP-SV与RAI(AF078037.1)序列相同, 确定iASPP-SV和iASPP(828)两个亚型来源于具有选择性启动子的iASPP的基因剪接。已有研究表明, iASPP能抑制p53, 有致癌作用<sup>[2,5]</sup>, 并且我们先前的结果表明, iASPP-SV抑制p53的转录活性<sup>[10]</sup>。本研究发现, 内源性iASPP-SV在多种肿瘤细胞系表达, 并且iASPP-SV比iASPP(828)更能明显促进NIH 3T3细胞增殖, iASPP-SV可能是癌基因。

已有研究证实, 人乳腺癌中iASPP表达上调, 在野生型p53基因的乳腺癌和白血病中, 敲除iASPP能增强乳腺癌细胞的化疗凋亡率和敏感性<sup>[5,8-9]</sup>。然而, 乳腺癌中iASPP(828)和iASPP-SV表达水平不清楚。本研究发现, iASPP-SV和iASPP(828)在p53野生型人乳腺癌中较p53突变型过表达。

已证实人类95%的多外显子基因具有选择性剪接的调控机制, 选择性剪接保证了转录组和蛋白质多样性<sup>[13]</sup>。很多癌症相关基因如p53具有选择性剪接作用。p53基因具有多个转录起始位点, 通过选择性剪接编码多个亚型<sup>[14]</sup>。ASPP家族中, ASPP2基因也编码两个亚型53BP2(1005氨基酸)和ASPP2(1128氨基酸)<sup>[15]</sup>。已有研究表明, ASPP2/53BP2可以与p53和NF-κB/p65结合, ASPP2能通过p53非依赖途径促进RAS诱导的凋亡和p53依赖途径抑制肿瘤生成<sup>[16]</sup>。NF-κB/p65与ASPP2/53BP2结合, 抑制ASPP2/53BP2诱导的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本研究发现, iASPP-SV能与NF-κB/p65结合并抑制其转录活性。并且有研究表明, 敲低iASPP能通过NF-κB途径降低原始淋巴细胞和正常纤维细胞凋亡水平<sup>[18]</sup>。这些研究表明, ASPP家族可能参与调节p53和NF-κB的活性, iASPP可能是

双功能蛋白，与不同蛋白相互作用，具有促进细胞生存和抑制细胞生存的特性<sup>[11,19]</sup>。因此，iASPP-SV可能作为乳腺癌治疗的有效靶点。

综上所述，癌基因*iASPP-SV*在*p53*野生型乳腺癌中表达上调并促进肿瘤形成。该研究为人们认识*iASPP-SV*在乳腺癌发生、发展中的作用机制提供了新的思路，*iASPP-SV*可能作为乳腺癌治疗的有效靶点，为乳腺癌的治疗提供了新的靶点和理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [ 1 ] HO D H, KIM H, KIM J, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) phosphorylates p53 and induces p21 (WAF1/CIP1) expression [ J ] . Mol Brain, 2015, 8(1): 54.
- [ 2 ] QIU S, CAI Y, GAO X, et al. A small peptide derived from p53 linker region can resume the apoptotic activity of p53 by sequestering iASPP with p53 [ J ] . Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 910-917.
- [ 3 ] HALABY M J, HARRIS B R, MISKIMINS W K, et al. Deregulation of IRES-mediated p53 translation in cancer cells with defective p53 response to DNA damage [ J ] . Mol Cell Biol, 2015, 35(23): 4006-4017.
- [ 4 ] LÓPEZ I, TOURNILLON A S, FÄHRAEUS R, et al. p53-mediated control of gene expression via mRNA translation during endoplasmic reticulum stress [ J ] . Cell Cycle, 2015, 14(21): 3373-3378.
- [ 5 ] MENG W D, CHU R X, WANG B Z, et al. Helicobacter pylori infection and expressions of apoptosis-related proteins p53, ASPP2 and iASPP in gastric cancer and precancerous lesions [ J ] . Pathol Biol (Paris), 2013, 61(5): 199-202.
- [ 6 ] SKENE-ARNOLD T D, LUU H A, UHRIG R G, et al. Molecular mechanisms underlying the interaction of protein phosphatase-1c with ASPP proteins [ J ] . Biochem J, 2013, 449(3): 649-659.
- [ 7 ] CHEN Y, YAN W, HE S, et al. In vitro effect of iASPP on cell growth of oral tongue squamous cell carcinoma [ J ] . Chin J Cancer Res, 2014, 26(4): 382-390.
- [ 8 ] KONG F, SHI X, LI H, et al. Increased expression of iASPP correlates with poor prognosis in FIGO IA2-IIA cervical adenocarcinoma following a curative resection [ J ] . Am J Cancer Res, 2015, 3(5): 1217-1224.
- [ 9 ] KIM J W, ROH J L, PARK Y, et al. Cytoplasmic iASPP expression as a novel prognostic indicator in oral cavity squamous cell carcinoma [ J ] . Ann Surg Oncol, 2015, 22(2): 662-629.
- [ 10 ] ZHANG X, DIAO S, RAO Q, et al. Identification of a novel isoform of iASPP and its interaction with p53 [ J ] . J Mol Biol, 2007, 368(4): 1162-1171.
- [ 11 ] NOTARI M, HU Y, KOCH S, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification [ J ] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(40): 16645-16650.
- [ 12 ] WANG F, YU L, WANG F, et al. Risk factors for breast cancer in women residing in urban and rural areas of eastern China [ J ] . J Int Med Res, 2015, 43(6): 774-789.
- [ 13 ] MEIJER M, CIJSOUW T, TOONEN R F, et al. Synaptic effects of munc18-1 alternative splicing in excitatory hippocampal neurons [ J ] . PLoS One, 2015, 10(9): e0138950.
- [ 14 ] MARCEL V, DICHTEL-DANJOY M L, SAGNE C, et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models [ J ] . Cell Death Differ, 2011, 18(12): 1815-1824.
- [ 15 ] TAKAHASHI N, KOBAYASHI S, JIANG X, et al. Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from *TP53BP2* gene by alternative splicing [ J ] . Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(2): 434-438.
- [ 16 ] TORDELLA L, KOCH S, SALTER V, et al. ASPP2 suppresses squamous cell carcinoma via RelA/p65-mediated repression of p63 [ J ] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(44): 17969-17974.
- [ 17 ] YANG J P, HORI M, TAKAHASHI N, et al. NF- $\kappa$ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2 [ J ] . Oncogene, 1999, 18(37): 5177-5186.
- [ 18 ] DIJSSELBLOEM N, GORIELY S, ALBARANI V, et al. A critical role for p53 in the control of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in TLR4-stimulated dendritic cells exposed to Genistein [ J ] . J Immunol, 2007, 178(8): 5048-5057.
- [ 19 ] SLEE E A, GILLOTIN S, BERGAMASCHI D, et al. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization [ J ] . Oncogene, 2004, 23(56): 9007-9016.

(收稿日期: 2015-11-09 修回日期: 2016-03-06)