

文章编号 1006-8147(2016)05-0386-05

论 著

慢病毒载体 PLKO.1-shp65 的构建及在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中功能的研究

黄环静

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津 300060)

摘要 目的: 构建 p65 降表达质粒并包装成慢病毒, 检测对 MDA-MB-231 细胞增殖转移能力的影响。方法: 将体外合成的 p65 干扰片段与 PLKO.1-puro 连接形成重组慢病毒质粒 PLKO.1-shp65, 在 293FT 细胞中进行包装, 产生重组慢病毒颗粒, 感染 MDA-MB-231 细胞。实时定量聚合酶链反应(PR-QPCR)、Western blot 检测细胞中 p65 表达情况。采用细胞计数的方法检测稳定降表达 p65 之后对细胞增殖能力的影响, 用 transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力的变化。用 RT-QPCR、Western blot 检测增殖转移相关基因细胞周期蛋白 E1(CCNE1)、细胞周期蛋白 D1(CCND1)、细胞周期蛋白 B1(CCNB1)、周期蛋白依赖性激酶(CDK1)、细胞分裂周期蛋白 7(CDC7)、细胞分裂周期相关蛋白 7(CDCA7)表达量的变化。结果: 用重组慢病毒颗粒 PLKO.1-shp65 感染 MDA-MB-231 细胞, p65 的表达量显著降低, 并且 MDA-MB-231 细胞的增殖以及迁移侵袭能力降低。同时增殖相关基因 CCNE1 和 CCND1, 转移相关基因 Snail、Slug 的表达量降低。结论: 干扰 p65 之后 MDA-MB-231 细胞的增殖、转移能力降低。

关键词 乳腺癌细胞; p65; 增殖; 转移**中图分类号** R737.9**文献标志码** A

Construction of p65 shRNA knockdown vector and its effect on breast cancer cell MDA-MB-231

HUANG Huan-jing

(Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To construct p65-silenced breast cancer cells by RNA interference technology and lentiviral vector, and to study the influence on proliferation and metastasis of breast cancer cell MDA-MB-231. **Methods:** Short hairpin RNA (shRNA) was designed and sub-cloned into PLKO.1-puro to construct lentiviral vector. MDA-MB-231 cells were infected, and the expression of p65 was detected by Western blot and RT-QPCR. The effect of p65 on metastasis was detected by transwell assay, and the proliferation ability was measured by cell counting experiment. The expression of proliferation and metastasis related genes were detected by RT-QPCR, Western blot. **Results:** The PLKO.1-shp65 was successfully constructed, and was stably expressed in MDA-MB-231 cells and could interfere with the expression of human p65 effectively. preliminary function study showed that p65 knockdown inhibited MDA-MB-231 cell proliferation and metastasis. The expression of proliferation and metastases related genes like Snail, Slug, CCNE1 and CCND1 were decreased significantly. **Conclusion:** p65-silenced may reduce the proliferation and metastasis ability of MDA-MB-231 cells.

Key words breast cancer; p65; proliferation; metastasis

乳腺癌是全球女性中发病率最高的恶性肿瘤, 严重威胁女性健康^[1]。乳腺癌术后易复发, 易发生远处转移, 并且易产生耐药性以及化疗耐受, 在我国乳腺癌的发生发展呈现一定的特殊性^[2], 因此探究乳腺癌发生发展机制对于治疗有很重要的意义。研究表明在乳腺癌的发生发展过程中伴随着 NF- κ B 信号通路的激活^[3], 其能调节多种增殖、转移相关的基因, 从而影响肿瘤的发生发展^[4]。p65 作为 NF- κ B

信号通路的关键转录因子, 在 NF- κ B 信号通路行使功能过程中起到至关重要的作用。NF- κ B 信号通路激活过程伴随着 p65 入核, 从而实现靶基因的调控, 干扰 p65 之后, NF- κ B 信号通路不能被激活, 失去对下游基因的调控作用。为探究 NF- κ B 信号通路在乳腺癌发生发展过程的作用, 我们构建了 p65 的降表达重组质粒, 将其包装成稳定干扰 p65 的慢病毒, 感染 MDA-MB-231 细胞。检测对 MDA-MB-231 细胞生物学行为的影响, 并探究相关机制。

作者简介 黄环静(1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 乳腺癌分子诊断与转移机制, E-mail: huanjing1989929@126.com。

1 材料方法

1.1 材料 限制性内切酶、连接酶、酶切 buffer 以及感受态细胞购自 TaKaRa。胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自美国 Fomentas 公司。琼脂糖粉末购自美国 Sigma 公司。Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。p65、 β -actin 抗体购自 Abcam 公司,Slug、Snail 抗体购自美国 CST 公司。Transwell 小室购自美国 BD 公司。干扰序列以及引物由生工生物合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养 MDA-MB-231 细胞,置于在 37℃,5% CO₂ 的条件下。对数期细胞用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 质粒的构建及鉴定 酶切体系:PLKO.1-puro 10-15 μ g, Age I 1 μ L, EcoR I 1 μ L, 10 \times GreenBuffer 5 μ L, 无核酸水补齐至 50 μ L, 37℃, 4 h 进行酶切。酶切后用 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物(未做酶切的 PLKO.1 载体做对照)。根据胶回收试剂盒说明,进行切胶回收,纯化,测定 DNA 浓度。

连接体系:PLKO.1-puro 胶回收产物 50 ng, T4 连接酶 1 μ L, T4 Buffer 5 μ L, PCR 产物 2 μ L, 无核酸水补齐至 50 μ L。反应温度为室温 4 h。将连接产物进行转化,在大肠杆菌感受态细胞中进行扩增,再用质粒提取试剂盒提取质粒。并用 BamH I、EcoR I 进行酶切验证,酶切体系:小提后的 DNA 2 μ L, BamH I、EcoR I 各 0.2 μ L, 10 \times GreenBuffer 1 μ L, 无核酸水补齐至 10 μ L。1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 慢病毒载体的包装 将 6×10^5 个 293FT 细胞接种于 6 孔板,第 2 天进行转染,转染体系:PLKO.1-p65 shRNA 2 μ g, psPAX2 1.5 μ g, psVSVG 0.5 μ g, Lipofectamine 2000 10 μ L。6 h 后更换新鲜培养基。转染 48 h 后发现细胞培养基颜色变成黄色,收集 293FT 培养上清,1 500 r/min 4℃离心 10 min,收集病毒颗粒,用 0.45 μ m 滤膜过滤掉细胞碎片,将病毒置于-80℃保存。

1.2.4 慢病毒感染细胞 将 MDA-MB-231 接种于 6 孔板,待细胞长到 70%~80%的饱和度,用慢病毒感染。病毒与培养基按照 1:1 的体积比加入到 6 孔板中,感染 12 h 后更换新鲜培养基。感染 72 h 后进行 puromycin 抗性筛选(2 μ g/mL),一般药筛两周后细胞可用来做后续实验。

1.2.5 细胞的迁移侵袭实验 将处于对数期的稳定干扰 p65 的 MDA-MB-231 细胞,用胰蛋白酶消

化,无血清培养基重悬,调整细胞浓度为 4×10^4 /mL,将 500 μ L 细胞悬液接种到迁移侵袭小室上室中,下室中加入 750 μ L 含 20%胎牛血清的培养基(侵袭小室使用前要置于 37℃水化 2 h)。12 h 和 24 h 后分别取出迁移和侵袭小室,4%多聚甲醛固定 20 min,吉姆萨染色 20 min,显微镜下观察。

1.2.6 细胞计数实验 将处于对数期的稳定干扰 p65 的 MDA-MB-231 细胞(1×10^4)接种于 24 孔板,每天将细胞用胰蛋白酶消化,重悬之后,用血细胞计数板计数法检测细胞的增殖情况。

1.2.7 RT-QPCR 将处于对数期的稳定干扰 p65 的 MDA-MB-231 细胞,用 PBS 轻轻冲洗两次,吸干残留 PBS,加入 500 μ L Trizol 裂解液,室温放置 20 min,提取总 RNA,并反转成 cDNA。40 ng 的 cDNA 用来做 RT-QPCR。PCR 反应体系为 20 μ L,反应条件为 50℃ 2 min, 95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 62℃ 1 min, 40 个循环。以 GAPDH 的 mRNA 表达量作为内参,标准化靶基因的表达。所用到的引物:GAPDH,上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物 5'-GAAGATGG TGATGGGATTTTC-3',探针 5'(FAM)-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-(TAMRA)3'; p65,上游引物 5'-TGCAGAAAGACATTGAGGT-3',下游引物 5'-TCTCCTCAATCCGCTGACGAT-3'; Twist1,上游引物 5'-ACTTCCTCTACCA GGTCCTC CAG3',下游引物 5'-CCTCCATCCTCCAGACCGAG AA-3',探针 5'(FAM)-TGTGGCTCAGGAGCGGCTCA GCTAC -(TAMRA)3'; Snail,上游引物 5'-AGCCTGGGTGCCCTCAAGAT-3',下游引物 5'-AGGTTGGAGCGGTC AG CGAA-3',探针 5'(FAM)-TGTCCGGACCCACACTGGCGAGAAG-(TAMRA)3'; Slug,上游引物 5'-TGCCTGTCATACCACAACCAGA-3',下游引物 5'-GGAGGAGGTGTCAGATGGAGGA-3',探针 5'(FAM)-ATCACTGTGTG GACTACC GCTGCTC-(TAMRA)3'。2^{- Δ CT} 为该样本中待测基因相对 GAPDH 的 mRNA 的表达量,其中各样本待测基因的 CT 值与 GAPDH 的 CT 值的差即 Δ CT。

1.2.8 Western blot 将处于对数期的稳定干扰 p65 的 MDA-MB-231 细胞,用 PBS 轻轻冲洗两次,吸干残留 PBS,加入 120 μ L 蛋白裂解液。冰上孵育 30 min,于 4℃,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清。测蛋白浓度,100℃加热变性。

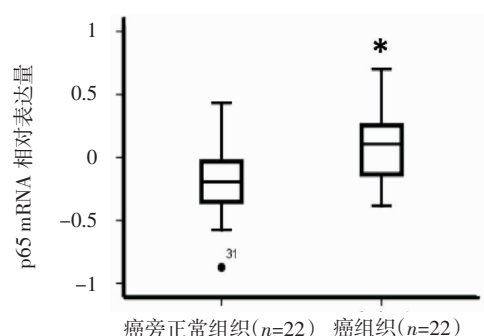
每孔蛋白上样量为 40 μ g, SDS-PAGE 变性电泳之后,转至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭 1 h, 4℃孵育一抗过夜, TBST 洗膜, 3 次, 每次 5 min。室温条件下孵育二抗 45 min, TBST 洗膜, 5 次, 每次 10 min,

ECL 化学发光试剂显色 1~2 min, X 胶片曝光检测蛋白表达量变化情况。

1.3 数据分析 临床病例资料来自 TCGA 数据库, 用 SPSS 17.0 软件进行配对 t 检验差异分析。其他数据用 t 检验进行差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p65 在乳腺癌以及癌旁正常组织中的表达量分析 用 22 对乳腺癌患者的临床病例, 分析癌组织以及癌旁正常组织中 p65 的表达量差异, 发现 p65 在癌组织中的表达量明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$), 见图 1。



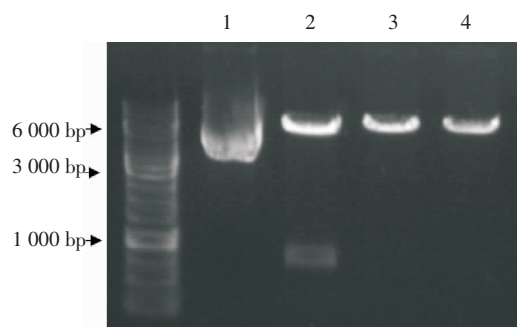
* $P < 0.05$

图1 乳腺癌组织中 p65 的表达量显著高于癌旁正常组织

Fig 1 p65 expression is higher in the tumor than in the tumor-adjacent normal tissue

2.2 重组质粒的酶切鉴定 对构建的 p65 降表达重组质粒进行验证。由于插入载体的外源片段较小, 若用 *Age*I、*Eco*R I 切割连接产物, 会将插入片段切开, 但是不能在琼脂糖凝胶电泳中检测出来, 所以我们在插入片段的同时将 *Eco*R I 酶切位点破坏。连接产物用 *Bam*H I、*Eco*R I 进行酶切, 空载体作为对照。琼脂糖凝胶电泳检测, 由于成功插入外源片段的质粒中 *Eco*R I 的酶切位点被破坏, 连接产物酶切后只有 1 条带出现在 7 000 左右, 如图 2 的第 3、4 列。未能成功插入外源 DNA 片段的载体 *Eco*R I 酶切位点未被破坏, 双酶切后有 2 条带, 分别出现在 1 000 bp 和 6 000 bp 左右, 说明载体与片段成功连接, 如图 2 第 2 列。

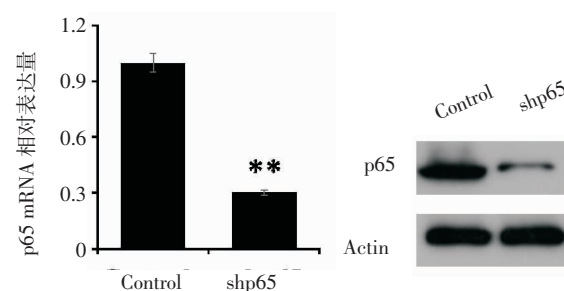
2.3 病毒干扰效率的检测 检测病毒感染后的 MDA-MB-231 细胞中 p65 表达量的变化, 发现在 PLKO.1-puro shp65 慢病毒感染组中 p65 的表达量明显低于对照组, 说明筛选之后的细胞中 p65 稳定降表达。见图 3。



1.空载体质粒;2.未成功连接的连接产物用 *Bam*H I、*Eco*R I 进行酶切;3、4.成功连接的连接产物用 *Bam*H I、*Eco*R I 进行酶切

图2 重组质粒的酶切鉴定

Fig 2 Result of enzyme digestion of recombinant plasmids



** $P < 0.01$

图3 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞后, 鉴定 p65 蛋白的表达水平

Fig 3 pLKO.1-puro shp65 infected MDA-MB-231 cells, western blot detected the expression of p65

2.4 PLKO.1-puro shp65 病毒感染 MDA-MB-231 细胞, 影响细胞形态和细胞增殖能力 显微镜下观察, 发现慢病毒感染后的 MDA-MB-231 细胞变得短小并且细胞的增殖能力显著降低, 见图 4。

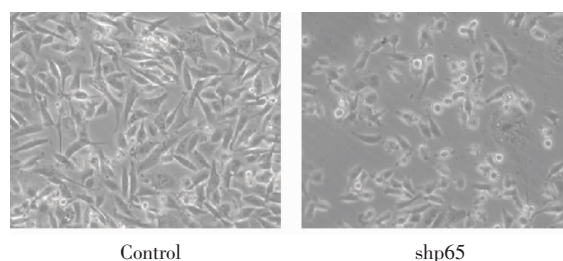


图4 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞, 观察细胞形态以及细胞的增殖能力变化

Fig 4 pLKO.1-puro shp65 infected MDA-MB-231 cells, and observed cell morphological changes and proliferation ability

2.5 稳定降表达 p65 影响增殖相关基因的表达 本文检测了 p65 降表达对细胞增殖相关基因表达量的影响, 发现 CDK1、CCNB1、CDC7、CDCA7 的表达量没有明显变化, CCNE1 和 CCND1 的表达量明显降低, 见图 5。

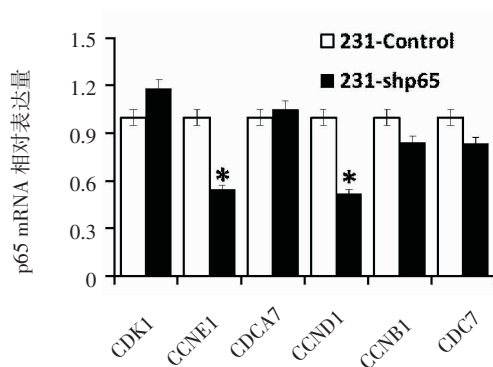
* $P < 0.05$

图5 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞后,检测增殖相关基因的表达量变化

Fig 5 pLKO.1-puro shp65 infected MDA-MB-231 cells and the expression of proliferation related genes

2.6 PLKO.1-puro shp65 病毒感染 MDA-MB-231 细胞,其迁移侵袭能力改变 药筛后的细胞进行 transwell 迁移侵袭实验,发现稳定降表达 p65 的细胞迁移侵袭能力显著降低,见图 6。

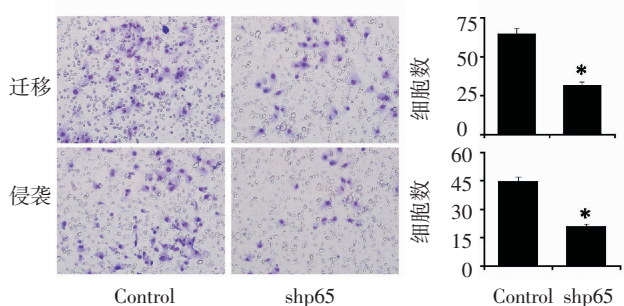
* $P < 0.05$

图6 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞后,Transwell 实验检测细胞的迁移侵袭能力

Fig 6 pLKO.1-puro shp65 infected MDA-MB-231 cells, Transwell detected the metastasis ability of MDA-MB-231 cells

2.7 PLKO.1-puro shp65 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞,影响转移相关基因的表达 本文检测了上皮间质转化(EMT)相关转录因子的表达量,发现稳定降表达 p65 之后 Slug 和 Snail 的表达量明显降低,见图 7。

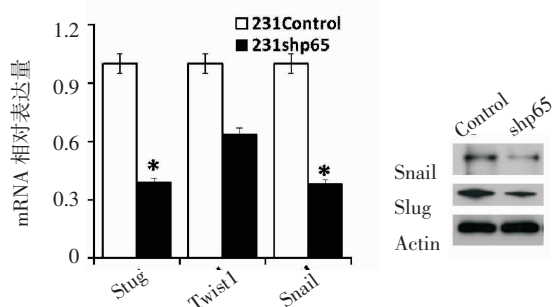
* $P < 0.05$

图7 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞后,检测 EMT 相关转录因子的表达量变化

Fig 7 pLKO.1-puro shp65 infected MDA-MB-231 cells and the expression of EMT related transcription factors

3 讨论

本文分析了 TCGA 数据库中 22 对临床病例,发现 p65 的表达量在癌组织中显著高于正常组织 ($P < 0.05$),预示着 p65 在乳腺癌的发生发展中的重要作用。p65 作为 NF- κ B 的亚单位,由于其具有特殊的反式激活结构域,可以作为转录因子调控下游靶基因的转录活性,从而在肿瘤的发生、发展中发挥着关键性作用,故成为了 NF- κ B 家族研究的焦点。干扰 p65 的表达能够抑制 NF- κ B 信号通路的活性,从而抑制肿瘤细胞的增殖及转移能力^[5-7]。

RNAi 是近年来发现的一种调控基因表达的生物技术,能够使基因转录产生的 mRNA 被相应的双链 RNA 分子结合,从而基因表达被特异的抑制^[8],为疾病的治疗提供了新的方案^[9]。慢病毒载体容易制备,感染效率高,安全性高,成为实验室研究中的重要工具^[10]。慢病毒干扰载体的制备是将慢病毒载体的特点和 RNAi 技术的优点结合到一起,使靶基因整合到宿主基因组中,得到靶基因稳定降表达的细胞系。在本文中我们成功构建了稳定干扰 p65 的慢病毒载体。

用制备好的慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞,发现细胞变得短小,并且增殖能力显著降低。Transwell 实验检测其迁移侵袭能力,发现干扰 p65 之后,细胞的迁移侵袭能力显著降低,RT-QPCR、Western blot 检测 EMT 相关转录因子以及增殖相关基因的表达量变化,发现 Slug、Snail、CCND1 和 CCNE1 的表达量明显降低。

p65 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖过程中起到至关重要的作用。在乳腺癌细胞中降表达 p65, CyclinD1 的表达量下降,细胞的 G1/S 期转化过程受到阻碍,乳腺癌细胞的增殖能力受到抑制^[11-12]。NF- κ B 还能够直接转录调节中心体复制相关的酶: Polo 样激酶 (polo-like kinase 4, PLK4), PLK4 作为 p65 的靶基因,介导 NF- κ B 调节细胞周期进程^[13]。在本文的研究中,我们检测了细胞周期相关基因的 mRNA 表达量,发现 p65 降表达之后 CCNE1 和 CCND1 的表达量降低。由于 CCNE1 和 CCND1 在细胞周期的进程中促进 G1/S 期的转化,结合前人的研究推测 p65 稳定降表达之后抑制了细胞周期 G1/S 期的转化。

EMT 是上皮细胞获得运动能力的重要机制^[14]。此过程中,上皮细胞失去细胞间连接并获得间质特性。EMT 的过程中常伴随着 EMT 相关转录因子的表达量变化,比如 Snail、Slug、Twist1、ZEB2、ZEB1 等,他们能够直接或者间接抑制 E-cad 的表达^[15]。多

种基因及信号分子参与 NF- κ B 调节乳腺癌细胞转移的过程。激活 NF- κ B 信号通路, p65 入核增多, 能够转录促进 Twist1 的表达, 促进乳腺癌细胞的转移^[9]。同时 NF- κ B 还能够促进基质金属蛋白酶(MMP-9) 的表达, 从而影响乳腺癌的转移能力^[16]。NF- κ B 能够诱导 COP9 信号复合体(CSN) 的形成, CSN 能够抑制 Snail 的泛素化降解, NF- κ B 间接的促进了 Snail 的表达^[17]。在正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中, 过表达 p65 抑制上皮标志物上皮细胞钙粘蛋白(E-cad) 的表达, 诱导间质标志物波形蛋白(VIM) 的表达, 使 MCF-10A 向恶性转化, 使细胞的转移能力增强^[18-19]。本文中检测了 EMT 相关转录因子 Snail、Slug、Twist1 的表达量变化, 发现在降表达 p65 之后, Snail、Slug 的表达量明显降低。关于 p65 影响 EMT 转录因子表达的具体机制还需进一步研究。

在乳腺癌细胞增殖转移的过程中涉及多种转录因子及信号分子, 他们之间的相互作用决定细胞的生物学行为。随着研究不断深入, p65 的很多新功能以及与上下游基因的关系也将逐渐被揭示, 可为乳腺癌诊断、治疗提供新的分子标志。

参考文献:

- [1] Autier P, Boniol M, La Vecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database[J]. *BMJ*, 2010, 341: c3620
- [2] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(8): 561
- [3] Li C W, Xia W Y, Huo L F, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1290
- [4] Lee R E, Walker S R, Savery K, et al. Fold change of nuclear NF- κ B determines TNF-induced transcription in single cells[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(6): 867
- [5] Ito-Kureha T, Koshikawa N, Yamamoto M, et al. Tropomodulin 1 expression driven by NF- κ B enhances breast cancer growth[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(1): 62
- [6] Paul A, Gunewardena S, Stecklein S R, et al. PKC λ /t signaling promotes triple-negative breast cancer growth and metastasis[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(9): 1469
- [7] 王玲, 单保恩, 曹玉, 等. 靶向 p65 基因的 miRNA 对人三阴性乳腺癌细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(2): 96
- [8] 徐俊, 毛颖, 苗荻, 等. RNA 干扰技术的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2012(3): 15
- [9] 安立峰, 董震. RNA 干扰——肿瘤研究的新工具[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(7): 385
- [10] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(12): 870
- [11] 王玲, 单保恩, 桑梅香, 等. 靶向沉默 p65 基因对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖及凋亡的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(10): 1742
- [12] 王玲, 赵连梅, 张超, 等. 沉默 p65 基因对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞周期的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(11): 1236
- [13] Ledoux A C, Sellier H, Gillies K, et al. NF κ B regulates expression of Polo-like kinase 4[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(18): 3052
- [14] 蔡隽. FOXQ1 稳定表达乳腺癌细胞系的建立及鉴定[J]. *天津医科大学学报*, 2015, 21(4): 292
- [15] Wang Q S, Kong P Z, Li X Q, et al. FOXF2 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of basal-like breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17: 30
- [16] Jacob A, Jing J, Lee J, et al. Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 20): 4647
- [17] Wu Y D, Deng J, Rychahou P G, et al. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(5): 416
- [18] Chua H L, Bhat-Nakshatri P, Clare S E, et al. NF- κ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2[J]. *Oncogene*, 2007, 26(5): 711
- [19] Dilly A K, Ekambaram P, Guo Y D, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase induces MMP9 expression and cellular invasion via activation of PI3K/Akt/NF- κ B[J]. *Inter J Cancer*, 2013, 133(8): 1784

(2016-04-13 收稿)