

文章编号 1006-8147(2014)06-0429-04

论 著

## 肌细胞增强因子 2A 基因真核表达质粒的构建及对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力的影响

伦淑敏

(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, 天津 300060)

**摘要** 目的: 构建肌细胞增强因子 2A(MEF2A) 基因真核表达重组质粒, 并转染乳腺癌细胞株观察其对细胞增殖能力的影响。方法: 实时定量聚合酶链反应(RT-QPCR)检测 MCF-7、BT474 及 MDA-MB-231 等 3 种乳腺癌细胞中 MEF2A mRNA 的表达。采用全基因合成法合成 MEF2A 编码区序列, 克隆入 pcDNA3.1(+)-HA 载体, 构建重组质粒 pcDNA3.1-MEF2A-HA。重组质粒转染乳腺癌细胞, 采用 Western blot 及 RT-QPCR 检测 MEF2A 的表达效率。细胞计数实验检测细胞的增殖能力。结果: 3 株乳腺癌细胞中, MDA-MB-231 细胞中 MEF2A mRNA 表达水平较低; 其基因测序结果显示与预期片段大小一致, 表明 MEF2A 重组质粒构建成功。将 MEF2A 重组质粒瞬时转染 MDA-MB-231 细胞后, MEF2A 表达质粒组与对照组比较, 其 MEF2A 表达升高, 细胞增殖能力增强。结论: 成功构建 MEF2A 过表达重组质粒, 在 MDA-MB-231 中过表达 MEF2A 促进细胞的增殖能力。

**关键词** 肌细胞增强因子 2A; 乳腺癌; 质粒; 增殖

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

### Construction of myocyte enhancer factor 2A eukaryotic expression plasmid and its effects on cell proliferation in breast cancer cell line MCF7

LUN Shu-min

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

**Abstract Objective:** To construct eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-MEF2A and examine its effect on the proliferation of breast cancer cell line. **Methods:** The MEF2A mRNA levels were detected in MCF-7, BT474 and MDA-MB-231 cells, respectively by real-time quantitative PCR (RT-QPCR). The full-length coding sequence of MEF2A was amplified by standard RT-QPCR. The amplified MEF2A was cloned into pcDNA3.1 vector. The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-MEF2A-HA was transfected into breast cancer cells. RT-QPCR and western blot were performed to measure the expression level of MEF2A. Cell counting was performed to evaluate the effects of MEF2A expression on cell proliferation. **Results:** The MEF2A mRNA expression level was low in MDA-MB-231 cells. Western blot and RT-QPCR indicated that transfection of MEF2A expression vector into MDA-MB-231 cells resulted in increased mRNA/protein levels of MEF2A. The forced MEF2A expression significantly enhanced cell proliferation of MDA-MB-231. **Conclusion:** The eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-MEF2A-HA is constructed successfully. Over-expression of MEF2A enhances proliferation ability of MDA-MB-231 cells.

**Key words** myocyte enhancer factor 2A; breast cancer; plasmid; proliferation

乳腺癌是全球女性发病和死亡中占第一位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 寻找乳腺癌相关癌基因及抑癌基因可为乳腺癌的诊断和治疗提供生物学靶点。肌细胞增强因子 (myocyte enhancer factor, MEF) 2A 基因能够转录调节多种基因的表达, 参与人体许多生理过程, 在肺癌的发生中起到诱导作用。然而对于 MEF2A 在乳腺癌中的作用少有报道。本研究通过构建 MEF2A 的真核表达质粒并将其转染乳腺癌细胞观察其对乳腺癌表型的影响, 从而研究 MEF2A 在

作者简介 伦淑敏(1988-), 女, 硕士在读, 研究方向: 乳腺癌相关基因的转录调控机制; E-mail: lunshuminvs@163.com。

乳腺癌进展过程中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和试剂 乳腺癌细胞株 MCF-7、BT549 及 MDA-MB-231 均来自于美国标准生物品收藏中心。RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自美国 GIBCO 公司, RNA 抽提试剂、Trizol、反转录试剂、实时定量 PCR 试剂、Lipofectamine™2000 及 pcDNA3.1 (+) 载体均购自美国 Invitrogen 公司, 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自美国 Foments 公司, 感受态细胞 CDH5 购自日本 TaKaRa 公司, 丙烯酰胺购自美国

Sigma 公司,HA 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,7500 型 Realtime PCR 仪来自美国 ABI 公司。

1.1.2 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转染 接种  $2 \times 10^5$  个细胞/孔于 6 孔板,在细胞为 80%~90%饱和度时用于转染,采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体转染,方法按照说明书。转染 48 h 后裂解细胞提取总 RNA 及蛋白进行下一步实验。以转染 pcDNA3.1-HA 空质粒的细胞为阴性对照,以未转染细胞为空白对照。

## 1.2 方法

1.2.1 MEF2A 基因 cDNA 全长的克隆 取生长至 80%饱和度的 MDA-MB-231 细胞,加入适量 Trizol 试剂按说明书提取细胞总 RNA。20  $\mu$ L 逆转录反应体系包括 5  $\mu$ g 总 RNA,反应条件为 16  $^{\circ}$ C 30 min,42  $^{\circ}$ C 30 min,85  $^{\circ}$ C 5 min,4  $^{\circ}$ C 保存。参考 NCBI 的 MEF2A 基因序列设计出 1 对扩增 MEF2A cDNA 全基因编码区的引物序列,上游引物:5'-GC-GAATTCATGGGGCGGAAGAAAATACAAATCA-3' (5' 端加 *EcoR* I 酶切位点),下游引物 5'-TCCTC GAGTTAGTCAACCCACGCGTCCATC-3' (5' 端加 *Xho* I 酶切位点)。以上述引物为模板进行 PCR,反应条件为:94  $^{\circ}$ C 4 min、94  $^{\circ}$ C 30 s、64  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 1.5 min;35 个循环。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察,回收目的片段。

1.2.2 MEF2A 真核表达质粒的构建 将回收的 MEF2A cDNA 和质粒 pcDNA3.1-HA 同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 于 37  $^{\circ}$ C 酶切过夜,电泳分离后回收目的基因片段和载体,将质粒载体与目的基因片段按比例加入含 DNA 连接酶的 20  $\mu$ L 反应体系,16  $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取单克隆菌落,200 r/min 37  $^{\circ}$ C 培养过夜,碱裂解法提质粒 DNA,*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定并送华大基因测序验证,确保表达框无误。大量扩增并纯化鉴定正确的重组质粒。

1.2.3 实验分组 实验分为 3 组:空白组(MCF-7 组),未经处理的原代细胞;阴性对照组(MCF-7-HA 组),转染 pcDNA3.1-HA 阴性对照;转染 MEF2A 组(MCF-7-MEF2A-HA 组),转染 pcDNA3.1-MEF2A-HA。

1.2.4 RT-QPCR 检测 MEF2A mRNA 的表达 提取总 RNA 并反转录,步骤同上。RT-QPCR 反应体系包括由 40 ng 总 RNA 反转录所得的 cDNA。PCR 反应条件为 50  $^{\circ}$ C 2 min,95  $^{\circ}$ C 2 min,95  $^{\circ}$ C 30 s,62  $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。 $C_T$  值为荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数。计算各样本待测基因的  $C_T$

值与 GAPDH 的  $C_T$  值的差即  $\Delta C_T$ , $2^{-\Delta C_T}$  则为该样本中待测基因相对于 GAPDH mRNA 的表达量。

## 1.2.5 Western blot 检测 MEF2A-HA 蛋白的表达

40  $\mu$ g 总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶(PAGE,4%浓缩胶、10%分离胶)80 伏电压下电泳 3 h 后,电转印至 PVDF 膜上(湿转 70 伏,3 h)。5%脱脂奶粉(pH 8.3 的 TBS-T 配制)室温封闭 1 h 后,加入一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS-T 洗膜 6 次后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 30~45 min,TBS-T 洗膜 6 次后与 ECL 化学发光试剂显色 1~2 min,曝光 X 胶片。一抗:兔抗人 HA 单克隆抗体(1:1 000), $\beta$ -Actin 单克隆抗体(1:5 000)。HRP 标记二抗:山羊抗鼠抗体(1:2 000),山羊抗鼠抗体(1:10 000)。

1.2.6 免疫荧光检测 MEF2A 的核定位 取对数生长期细胞,胰酶消化细胞后接种到 24 孔板中,待细胞接近长成单层,取出孔板,4%多聚甲醛固定,含 1%Triton X-100 的 PBS 溶液 37  $^{\circ}$ C 作用 30 min,非免疫动物血清 37  $^{\circ}$ C 封闭 40 min,吸净血清后分孔做好标记加入 HA(1:100),4  $^{\circ}$ C 湿盒过夜,次日预冷的 PBS 溶液冲洗 5 min $\times$ 3 次后避光分别加入相应的荧光标记二抗(1:50),加入四甲基异硫氰罗丹明(tetramethylrhodamineisothiocyanate,TRITC)标记的二抗(1:50)置湿盒内,避光孵育 30 min,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)(1:1 000)避光 37  $^{\circ}$ C 复染细胞核 20 min。PBS 冲洗后,使用倒置荧光显微镜(TE2000,NIKON)观察成像。

1.2.7 细胞增殖实验 每组细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔细胞密度接种于 24 孔板中。每 24 h 计数 1 次,每次 3 孔细胞,计算平均值,连续计数 5 d。以相对细胞数为纵坐标,以培养时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.8 平板细胞克隆形成实验 细胞分别 6 孔板进行转染,24 h 后消化细胞成单细胞悬液,6 孔板每孔接种  $2 \times 10^2$  个细胞,使细胞分散均匀。置细胞培养箱中培养 3 周,PBS 洗 3 次后用 4%多聚甲醛固定 15 min,之后 0.2%台盼兰染色 10 min,PBS 洗 3 次晾干。

1.3 统计学处理 实验数据的整理、分析使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 乳腺癌细胞中 MEF2A 的表达 在 3 株乳腺癌细胞 MCF7、BT549、MDA-MB-231 细胞中,MEF2A 在 MCF7 中表达最低。故选择 MCF7 细胞株用于后续转染实验(图 1)。

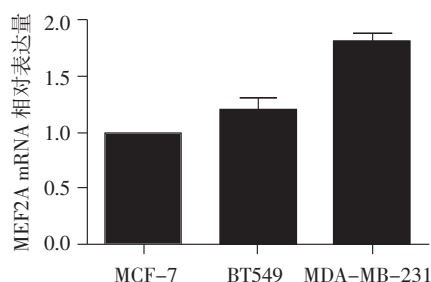


图1 乳腺癌细胞中MEF2A的表达

Fig 1 Expression of MEF2A in breast cancer cell lines

2.2 MEF2A 真核表达质粒瞬时转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞鉴定 应用 RT-QPCR 方法鉴定表达质粒的转染效果,转染质粒 pcDNA3.1-MEF2A-HA 的 MCF-7 (MCF-7-MEF2A-HA) 细胞中 MEF2A mRNA 的表达量约是其它两组细胞的 600 倍。Western blot 用 HA 标签蛋白的抗体检测,显示在 55 kDa 处,即 MEF2A 与 HA 融合后蛋白的位置,只有

转染 pcDNA3.1-MEF2A-HA 的一组有条带。结果见图 2。

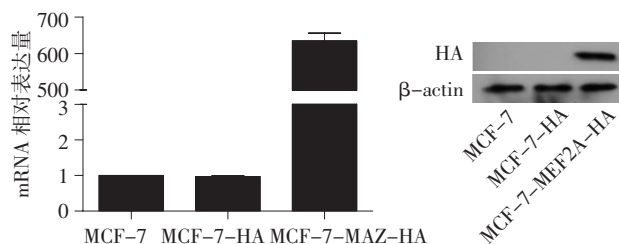


图2 3组细胞中MEF2A mRNA(左)的表达及MEF2A-HA融合蛋白(右)表达的验证

Fig 2 The mRNA (Left) expression levels of MEF2A and the protein of MEF2A-HA (Right) in MCF-7, MCF-7-HA and MCF-7-MEF2A-HA cells

2.3 转染 MEF2A 后检查核定位情况 采用 MEF2A 转染乳腺癌细胞 MCF7,HA 抗体检测 MEF2A 的亚细胞定位,MEF2A 定位于核(图 3)。

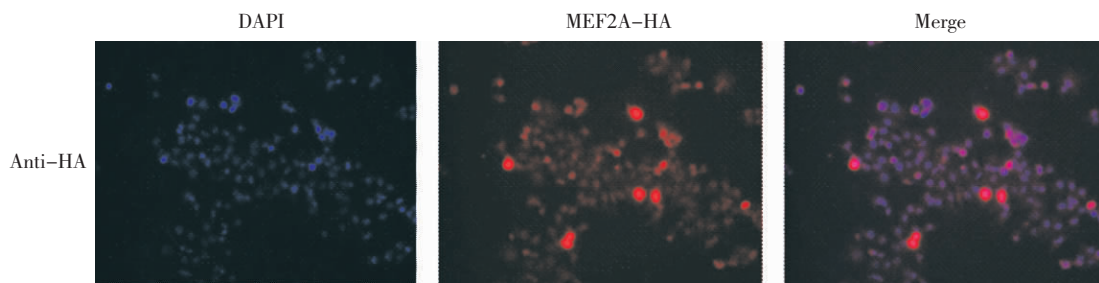


图3 免疫荧光验证质粒核定位情况

Fig 3 Immunofluorescence technique determining MEF2A-HA localized in the nuclei of MCF-7 cells

2.4 MEF2A 高表达后细胞增殖能力的改变 转染空质粒的 MCF-7 细胞(MCF-7-HA)及转染 MEF2A 的 MCF-7 细胞(MCF-7-MEF2A-HA)两组细胞进行细胞计数实验。结果表明,转染 MEF2A 的实验组细胞较对照组细胞增殖能力明显增强(图 4)。

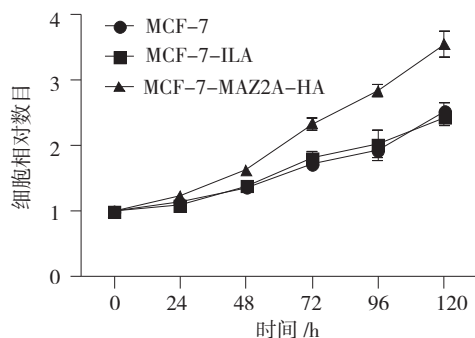


图4 细胞计数实验检测细胞增殖能力

Fig 4 Cell counting for cell proliferation analysis

2.5 MEF2A 高表达后细胞克隆形成能力的改变 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中过表达 MEF2A 可

显著抑制细胞的克隆形成能力,与空白对照组和阴性对照组相比,实验组克隆形成率明显增加(图 5)。

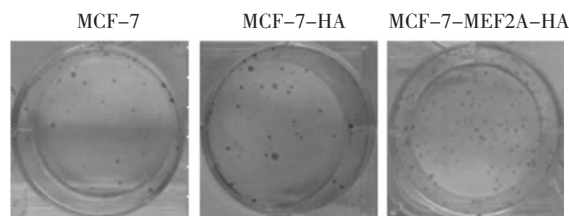


图5 平板克隆形成试验结果

Fig 5 Results of plate clone formation test

### 3 讨论

MEF2 基因是由 4 个基因(MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D)组成的多基因家族。MEF2A 基因是 MEF2 家族成员,位于染色体 15q26.3 上,它编码的 MEF2A 蛋白是转录因子蛋白,能够与富含 A/T 的基因序列结合,调控基因的表达<sup>[2]</sup>。MEF2A 的 N 端为含有包含 MADS 结构域和 MEF2 结构域的保



守序列,能够与其它因子形成二聚体并具有 DNA 结合活性,C 端负责转录活性和核区的定位,含有磷酸化位点,是多种激酶的靶点,与启动基因表达有关。MEF2 因子以同源或异源二聚体形式发挥作用,其蛋白多结合在许多肌特异性基因的调控区域,控制转录过程<sup>[3-4]</sup>。

MEF2A 对于骨骼肌及心肌的发育极其重要。MEF2 最显著的功能是控制肌细胞分化过程中的基因转录,在骨骼肌、心肌和平滑肌的发育过程中介导细胞的分化<sup>[5-7]</sup>。在心肌细胞中突变 MEF2A 基因或沉默 MEF2A 的表达会导致血管平滑肌细胞去分化,细胞运动及生长能力增强<sup>[8]</sup>。MEF2A 参与癌的发生发展。Bai 等<sup>[9]</sup>报道,激活的肝星形细胞中高表达 MEF2A 及 2C,过表达的 MEF2A 及 2C 通过招募组蛋白乙酰化酶(class IIa histone deacetylases,HDACs)介导肝癌的发生。在癌的进展过程中,MEF2A 能够介导 TGF $\beta$  诱导 MMP10 表达的作用,从而参与癌细胞的增殖、迁移及侵袭作用<sup>[10]</sup>。

MEF2A 作为转录因子通过调节基因表达还参与人体内许多生理过程。例如,MEF2 蛋白与 V-ATP 酶 d2 的启动子区结合,通过转录激活其蛋白表达,参与骨动态平衡<sup>[11]</sup>。MEF2 还能调控激素诱导的类固醇相关基因 Nr4a1 的表达,从而作为一种新型的睾丸特异性转录因子,在男性性别分化和功能中发挥作用<sup>[12]</sup>。

本研究构建了带有标签蛋白 HA 的 MEF2A 的真核表达质粒,并转染 MCF-7 细胞后利用 Western blot 及 RT-QPCR 方法验证了其表达效率。作为转录因子,MEF2A 蛋白定位于核,本研究通过免疫荧光实验验证了表达质粒 pcDNA3.1-MEF2A-HA 所表达的融合蛋白 MEF2A-HA 的核定位情况,进一步证实了重组质粒的有效性。MEF2A 在乳腺癌中的作用报道较少,本研究发现,在乳腺癌细胞系 MCF-7 中过表达 MEF2A 能够促进细胞的增殖能力,其具体机制还需进一步研究。

综上所述,MEF2A 在人体内发挥不可或缺的功能,在癌的发生发展中作用也不可忽视,本研究构

建了 MEF2A 的真核表达质粒并转染了乳腺癌细胞系 MCF-7,检测到其细胞增殖能力及克隆形成能力增强。本研究初步探索了 MEF2A 在乳腺癌中的作用,其机制尚需进一步探索和验证。

#### 参考文献:

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74
- [2] Black B L, Molkentin J D, Olson E N. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(1): 69
- [3] Nguyen H T, Bodmer R, Abmayr S M. D-mef2: a drosophila mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(16): 7520
- [4] McKinsey T, Zhang C L, Olson E N. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(1): 40
- [5] Seok H Y, Tatsuguchi M, Callis T E, et al. miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(41): 35339
- [6] Al Madhoun A S, Mehta V, Li G, et al. Skeletal myosin light chain kinase regulates skeletal myogenesis by phosphorylation of MEF2C[J]. EMBO J, 2011, 30(12): 2477
- [7] Tessier S N, Storey K B. Myocyte enhancer factor-2 and cardiac muscle gene expression during hibernation in thirteen-lined ground squirrels[J]. Gene, 2012, 501(1): 8
- [8] Zhao W, Zhao S P, Peng D Q. The effects of myocyte enhancer factor 2A gene on the proliferation, migration and phenotype of vascular smooth muscle cells[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(2): 108
- [9] Bai X, Wu L, Liang T, et al. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(1): 83
- [10] Ishikawa F, Miyoshi H, Nose K, et al. Transcriptional induction of MMP-10 by TGF- $\beta$ , mediated by activation of MEF2A and downregulation of class IIa HDACs[J]. Oncogene, 2010, 29(6): 909
- [11] Feng H T, Cheng T, Steer J H, et al. Myocyte enhancer factor 2 and microphthalmia-associated transcription factor cooperate with NFATc1 to transactivate the V-ATPase d2 promoter during RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(21): 14667
- [12] Daems C, Martin L J, Brousseau C, et al. MEF2 is restricted to the male gonad and regulates expression of the orphan nuclear receptor nr4a1[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(6): 886

(2014-04-14 收稿)