

文章编号 1006-8147(2014)05-0337-05

论 著

HOXA5 基因真核表达质粒的构建及在乳腺癌细胞中的功能研究

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 HOXA5 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迁移能力的影响。方法:实时定量聚合酶链反应(RT-QPCR)检测 MCF7、BT474 及 MDA-MB-231 等 3 种乳腺癌细胞中 HOXA5 mRNA 的表达。采用全基因合成法合成 HOXA5 编码区序列,克隆入 pcDNA3.1(+)载体,构建重组质粒 pcDNA3.1-HOXA5。重组质粒转染乳腺癌细胞,采用 Western blot 及 RT-QPCR 检测 HOXA5 的表达效率。观察细胞形态并通过细胞划痕实验检测细胞的迁移能力。结果:3 株乳腺癌细胞中,MDA-MB-231 细胞中 HOXA5 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 HOXA5 重组质粒构建成功。将 HOXA5 重组质粒瞬时转染 MDA-MB-231 细胞后,检测到其 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调,MDA-MB-231 细胞的迁移能力降低,EMT 相关转录因子 Twist 的表达显著下调。结论:成功构建 HOXA5 过表达重组质粒,在 MDA-MB-231 中过表达 HOXA5 抑制乳腺癌的迁移能力。

关键词 HOXA5; 乳腺癌; 质粒; 迁移

中图分类号 R73

文献标志码 A

Construction of HOXA5 eukaryotic expression plasmid and its biological significance in breast cancer cells

LUN Shu-min

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

Abstract Objective: To construct eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-HOXA5 and examine its effect on the migration of the breast cancer cell line. **Methods:** The HOXA5 mRNA levels were detected in MCF7, BT474 and MDA-MB-231 cells, respectively, by real-time quantitative PCR. The full-length coding sequence of HOXA5 was amplified using standard RT-QPCR. The amplified HOXA5 was cloned into pcDNA3.1 vector. And the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-HOXA5 was transfected into breast cancer cells. RT-QPCR and Western blot were performed to measure the expression level of HOXA5. The cell morphology changes were observed. The migration ability of the cells was also observed through scratch assay. **Results:** The HOXA5 mRNA expression level of MDA-MB-231 was low in MDA-MB-231 cells. Western blot and RT-QPCR indicated that transfection of HOXA5 expression vector into MDA-MB-231 cells resulted in enhanced mRNA/protein levels of HOXA5. The forced HOXA5 expression significantly decreased cell migration of MDA-MB-231 and down-regulated the expression of Twist. **Conclusion:** The eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-HOXA5 can be successfully constructed. Over-expression of HOXA5 inhibits the migration ability of MDA-MB-231 cells.

Key words HOXA5; breast cancer; plasmid; migration

乳腺癌是全球女性发病和死亡中占第一位的恶性肿瘤,转移是乳腺癌患者死亡的首要原因^[1]。因此,发现与乳腺癌转移相关的基因对于乳腺癌的预后评估和抗肿瘤治疗提供新的诊断标志和治疗靶点有重要意义。同源盒 A5(Homeobox A5, HOXA5)

基因广泛表达于人体的不同组织,能够转录调节多种基因的表达,研究表明,HOXA5 在非小细胞肺癌及乳腺癌中起到抑制癌症发生的作用^[2-3]。然而对于 HOXA5 在乳腺癌转移中的作用少有报道。本研究通过构建 HOXA5 的真核表达质粒并将其转染乳腺癌细胞观察其对乳腺癌细胞表型的影响,从而研究 HOXA5 在乳腺癌进展过程中的作用。

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。

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 MCF7、BT474 及 MDA-MB-231 均来自于美国标准生物物品收藏中心。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、LipofectamineTM2000 及 pcDNA(3.1+) 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 Fomentas 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, HOXA5 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司, 7500 型 Realtime PCR 仪来自美国 ABI 公司。

1.1.2 细胞培养 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT474 及 MCF7 细胞来源于美国标准生物物品收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), MDA-MB-231 和 BT474 细胞采用 RPMI-1640 培养液(GIBCO 公司, 美国), MCF7 细胞采用高糖 DMEM/F12 培养液(GIBCO 公司, 美国), 所有细胞于含 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS) 的培养液中, 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 用于体外和体内实验。

1.1.3 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转染 接种 2×10^5 个细胞/孔于 6 孔板, 在细胞为 80%~90% 饱和度时用于转染, 采用 LipofectamineTM 2000 脂质体颗粒转染, 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 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 HOXA5 基因 cDNA 全长的克隆 取生长至 80% 饱和度的 MCF7 细胞, 加入适量 Trizol 试剂按说明书提取细胞总 RNA。20 μ L 逆转录反应体系包括 5 μ g 总 RNA, 反应条件为 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保存。参考 NCBI 的 HOXA5 基因序列设计出 1 对扩增 HOXA5 cDNA 全基因编码区的引物序列, 上游引物: 5'-GGAATTCACGAC-CGCGAGCCACAAATCAA-3' (5' 端含 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物 5'-CCTCGAGGCTCAGATACTCAGGGACGGA-3' (5' 端含 *Xho* I 酶切位点)。以上述引物为模板进行 PCR, 反应条件为: 94 °C 4 min、94 °C

30 s、62 °C 30 s、72 °C 1 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 HOXA5 真核表达质粒的构建及鉴定 将回收的 HOXA5 cDNA 和质粒 pcDNA3.1 同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 于 37 °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摩尔比 1:8 加入含 DNA 连接酶的 20 μ L 反应体系, 16 °C 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37 °C 培养过夜。次日挑取单克隆菌落, 200 r/min 37 °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 (MDA-MB-231 组), 未经处理的原代细胞; 阴性对照组 (231-Vector 组), 转染 pcDNA3.1 阴性对照; 转染 HOXA5 组 (231-HOXA5 组), 转染 pcDNA3.1-HOXA5。

1.2.4 RT-QPCR 检测 HOXA5 的表达 提取总 RNA 并反转录, 步骤如上。RT-QPCR 反应为 20 μ L 体系, 包括由 40 ng 总 RNA 反转录所得的 cDNA。PCR 反应条件为 50 °C 2 min, 95 °C 2 min, 95 °C 30 s, 62 °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 ΔC_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 HOXA5 蛋白的表达 40 μ 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 °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: 鼠抗 HOXA5 单克隆抗体 (1:1 000), β -Actin 单克隆抗体 (1:5 000)。HRP 标记二抗: 山羊抗鼠抗体 (1:2 000 & 1:10 000)。

1.2.6 细胞划痕实验测细胞迁移能力 以 5×10^4 孔的细胞密度将细胞接种至 6 孔板中, 待细胞生长至 80% 饱和度左右, 移除培养液, 在各孔中垂直划痕, PBS 清洗漂浮细胞后, 继续培养, 观察细胞迁

移情况。

1.2.7 RT-QPCR 检测 EMT 相关转录因子及标志物的变化 反转录及 RT-QPCR 步骤如上,检测 3 组细胞中 EMT 相关转录因子 Twist、Snail、Slug mRNA 表达量。

1.3 统计学方法 SPSS 17.0 统计软件进行实验数据的整理、分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间差异的分析用一元方差,检测空白对照组与其余各组比较用 $LSD-t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞中 HOXA5 的表达 在 3 株乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 和 BT549 细胞中,HOXA5 在 MDA-MB-231 中表达最低。故选择 MDA-MB-231 细胞株用于后续转染实验(图 1)。

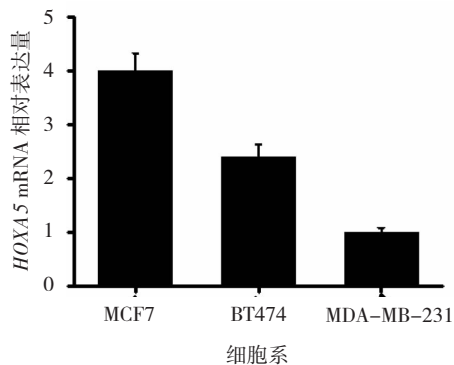


图 1 乳腺癌细胞中 HOXA5 的表达

Fig 1 Expression of HOXA5 in breast cancer cell lines

2.2 HOXA5 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-HOXA5 的 MDA-MB-231(231-HOXA5)细胞中 HOXA5 mRNA 的表达量约是其它两组细胞的 1 000 倍。Western blot 用 HOXA5 抗体检测,显示 231-HOXA5 的 HOXA5 蛋白表达增多。结果见图 2。

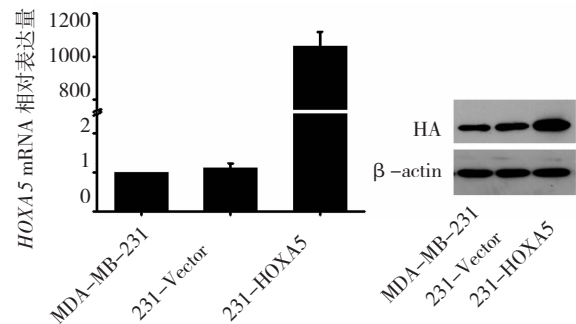


图 2 3 组细胞中 HOXA5 mRNA(左)及蛋白(右)表达量

Fig 2 The mRNA(Left)and the protein(Right) expression levels of HOXA5 in MDA-MB-231,231-Vector and 231-HOXA5 cells

2.3 转染 HOXA5 后乳腺癌细胞形态学改变 采用 HOXA5 转染乳腺癌细胞 MDA-MB-231,具有间质特性且高转移潜能的 MDA-MB-231 细胞伪足显著缩短,细胞间粘附显著增加,细胞间连接紧密。见图 3。

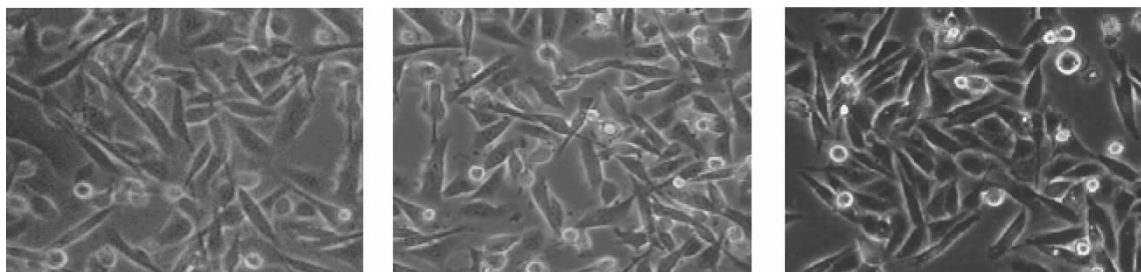


图 3 3 组细胞形态观察($\times 200$)

Fig 3 The cell morphology of MDA-MB-231,231-Vector and 231-HOXA5 cells ($\times 200$)

2.4 HOXA5 高表达后细胞迁移能力的改变 转染空质粒的 231 细胞(231-pcDNA3.1)及转染 HOXA5 的 231 细胞(231-pcDNA3.1-HOXA5),两组细胞进行划痕实验。结果表明,转染 HOXA5 的实验组细胞较对照组细胞迁移能力明显降低。见图 4。

2.5 HOXA5 对 EMT 相关转录因子的影响 3 组细胞分别检测 Twist、Snail、Slug 3 种 EMT 相关转录因子 mRNA 的表达量,结果表明,过表达 HOXA5 后 Twist 的表达量明显降低。见图 5。

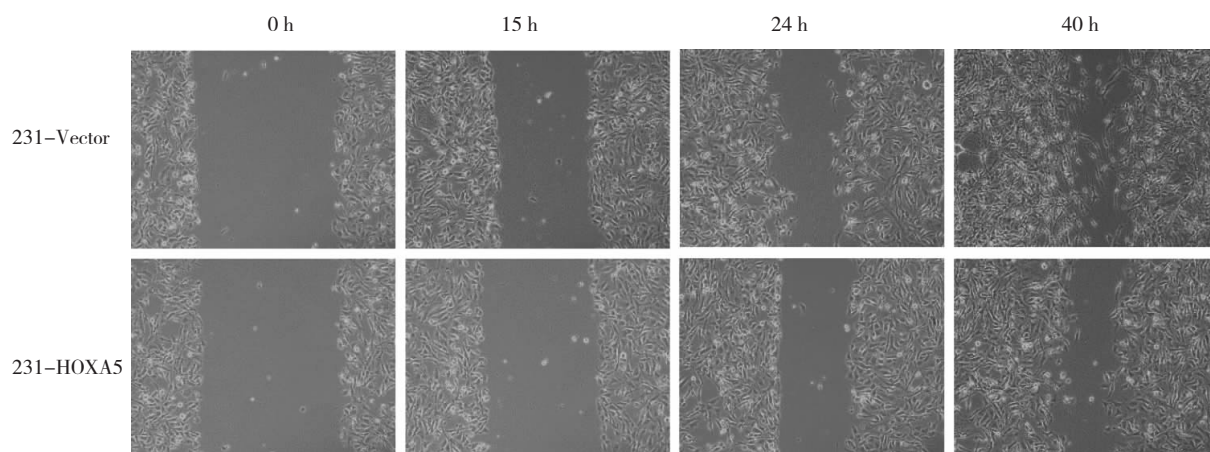


图4 划痕实验观察细胞的迁移能力

Fig 4 The migration ability of the cells were observed by scratch assay

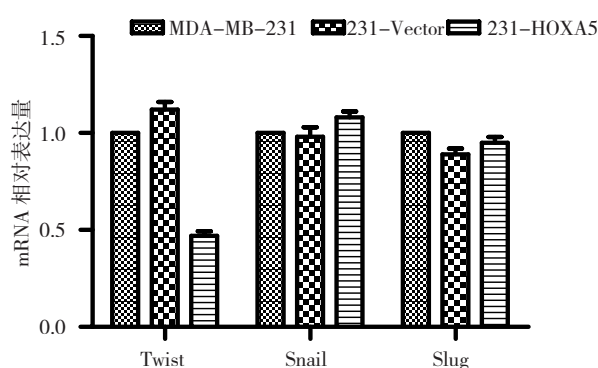


图5 3组细胞中 EMT 相关转录因子的表达

Fig 5 The expression levels of EMT-inducing transcription factors in three groups

3 讨论

乳腺癌是一种异质性疾病,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。

同源盒基因是含有 183 个核苷酸序列,编码 61 个氨基酸的一组高度保守的同源异构体,具有 DNA 结合活性^[4-5]。人体内有 4 种 HOX 基因簇(HOXA-D),均可作为转录因子调控能够影响细胞功能的一系列下游基因^[6-7]。研究发现,HOXA5 上调其直接下游靶基因视黄酸受体 β 的表达,通过视黄酸介导的细胞凋亡及细胞生长抑制作用,进而在抗肿瘤中发挥重要作用^[8]。Golpon 等^[2]发现,沉默 HOXA5 的表达与肺癌的发生密切相关。进一步在非小细胞肺癌 A549 中通过 micRNA 抑制 HOXA5 的表达,可促进细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[9]。同样,在乳腺癌发生过程中,抑制 HOXA5 将限制 P53 的表达从而致癌^[3]。综上所述,HOXA5 是癌发生的抑制性因素。

本研究表明,在 3 株细胞系中,以 MCF7 中的

HOXA5 mRNA 表达量为最高,而在 MDA-MB-231 细胞中,HOXA5 表达量明显低于其它细胞系。MDA-MB-231 细胞是 basal-like 型乳腺癌细胞系,因为大多数 basal-like 亚型乳腺癌缺乏 ER、PR 及 HER2 的表达,所以很多研究将三阴性乳腺癌(ER-/PR-/HER-2-)定义为 basal-like 亚型乳腺癌。分子分型与预后密切相关,Ilhemelandu 等^[10]对 372 例乳腺癌患者随访的结果显示 Triple negative 型乳腺癌的远处转移率明显高于 Luminal 型和其他类型,是预测远处转移的独立预后因素 ($P<0.05$)。而 HOXA5 在恶性程度较高的 MDA-MB-231 细胞中的低表达及在恶性程度较低的 luminal 型乳腺癌细胞 MCF7 及 BT474 中表达量较高,提示其低表达可能与细胞的恶性程度高有关。进一步实验结果表明,MDA-MB-231 过表达 HOXA5 后,细胞形态发生明显变化,由梭形变为短圆,相互之间黏附作用增加,进一步提示 HOXA5 可能作为抑制肿瘤细胞恶性表型的因素存在。

上皮-间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重塑是细胞迁移能力改变的重要机制。EMT 与细胞的运动能力的改变密切相关^[11],EMT 是一个可逆的转分化过程,发生 EMT 的上皮细胞获得间质细胞的特性,如运动和侵袭^[12]。大量证据表明,EMT 在肿瘤的进展及转移中发挥重要作用^[13]。细胞发生 EMT 时,上皮细胞失去极性,细胞黏附力下降,迁移和运动能力增加,上皮细胞表现出间质细胞表型^[14-15]。ECM 重塑是肿瘤细胞侵袭和转移的另一关键环节,在肿瘤微环境中,肿瘤细胞既分泌细胞外基质组分又分泌 ECM 降解酶实现对 ECM 的

重塑,为肿瘤细胞侵袭和转移提供条件^[16]。HOXA5 可能通过调节以上过程调控乳腺癌细胞的转移能力。

本实验通过检测 EMT 相关转录因子表达量的变化进一步探索了细胞迁移能力改变的机制,EMT 相关转录因子,如 Twist、Snail、Slug 等与肿瘤的迁移侵袭密切相关。本研究检测了 EMT 相关转录因子的 mRNA 表达量,结果表明,过表达 HOXA5 后转录因子 Twist 的表达量明显降低,提示 HOXA5 能够抑制 EMT 的发生。

综上所述,HOXA5 在乳腺癌细胞中起到抑制肿瘤细胞转移的作用,可能为乳腺癌预后及治疗提供新的分子标志,关于介导 HOXA5 抑制转移的下游靶点及具体机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Mohan A, Ponnusankar S. Newer therapies for the treatment of metastatic breast cancer: a clinical update[J]. Indian J Pharm Sci, 2013,75(3):251
- [2] Golpon H A, Geraci M W, Moore M D, et al. HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema[J]. Am J Pathol, 2001,158(3):955
- [3] Raman V, Martensen S A, Reisman D, et al. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours[J]. Nature, 2000,405(6789):974
- [4] Simon H G, Tabin C J. Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 expression during newt limb regeneration: differential regulation of paralogous Hox genes suggest different roles for members of different Hox clusters[J]. Development, 1993,117(4):1397
- [5] Akam M. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates[J]. Cell, 1989,57(3):347
- [6] Xu B, Geerts D, Bu Z, et al. Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes[J]. Hum Reprod, 2014,29(4):781
- [7] Calero-Nieto F J, Joshi A, Bonadies N, et al. HOX-mediated LMO2 expression in embryonic mesoderm is recapitulated in acute leukaemias[J]. Oncogene, 2013,32(48):5471
- [8] Chen H, Zhang H, Lee J, et al. HOXA5 acts directly downstream of retinoic acid receptor beta and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition[J]. Cancer Res, 2007,67(17):8007
- [9] Liu X H, Lu K H, Wang K M, et al. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung Cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5[J]. BMC Cancer, 2012,12:348
- [10] Ihmelandu C U, Leffall L D, Dewitty R L, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival[J]. J Surg Res, 2007,143(1):109
- [11] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic[J]. Biochim Biophys Acta, 2009,1796(2):75
- [12] Thierry J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009,139(5):871
- [13] Yang J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6):818
- [14] Schramm H M. Should EMT of Cancer cells be understood as Epithelial-Myeloid transition[J]. J Cancer, 2014,5(2):125
- [15] Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005,17(5):548
- [16] Casey T, Bond J, Tighe S, et al. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009,114(1):47

(2014-04-14 收稿)

医学论文中被误用为单位符号的“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,而“ppm、ppb、ppt”不是量纲一的量的单位的专门名称,也不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL ,则 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 相当于 1 ppm ;如果溶液密度不是 1 g/mL ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 cm^3/m^3 、 mL/m^3),换算关系是: $1\text{ ppm}=1\text{ cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$, $1\text{ ppb}=10^{-9}$, $1\text{ ppt}=10^{-12}$;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 mg/m^3 、 g/m^3),换算关系是: $C=22.4\text{ X}/M$,式中:X为污染物以 mg/m^3 表示的浓度值;C为污染物以 ppm 表示的浓度值;M为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为: $1\text{ ppm}=1\text{ mg/kg}=1\text{ 000 }\mu\text{g/kg}$; $1\text{ ppb}=1\text{ }\mu\text{g/kg}=10^{-3}\text{ mg/kg}$; $1\text{ ppt}=1\text{ ng/kg}=10^{-6}\text{ mg/kg}$ 。

本刊编辑部