

文章编号 1006-8147(2015)04-0292-04

论著

FOXQ1 稳定表达乳腺癌细胞系的建立及鉴定

蔡 隼

(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: 建立稳定过表达 FOXQ1 乳腺癌细胞系, 为进一步研究 FOXQ1 在体内乳腺癌转移、血管生成、抗凋亡机制, 以及以 FOXQ1 为靶点开发抗肿瘤药物提供细胞研究模型。方法: 采用脂质体转染的方法将真核表达质粒 FOXQ1 转染至 MDA-MB-231-luc 细胞, 经 G418 筛选及克隆化培养, 获得稳定过表达 FOXQ1 蛋白的细胞系。通过 RT-qPCR、Western blot 对细胞系中 FOXQ1 的表达进行鉴定。通过 Transwell 迁移侵袭等实验, 观察过表达 FOXQ1 后对 231-luc 细胞 EMT 相关蛋白表达、231-luc 细胞迁移侵袭等生物学特性的影响。结果: 获得过表达 FOXQ1 的稳定细胞系, 迁移侵袭实验表明该细胞系恶性化程度明显高于野生型。结论: 成功建立稳定过表达 FOXQ1 的乳腺癌细胞系, FOXQ1 在细胞核中高表达, 进而增加 EMT 间质标志物 Fn1、Vim 的表达, 增强 231-luc 的迁移侵袭能力。

关键词 FOXQ1; 过表达; 乳腺癌; 迁移; 侵袭

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Establishment and identification of cell lines with stable expression of FOXQ1 in MDA-MB-231-luc

CAI Jun

(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 establish stable breast cancer cell line expressing FOXQ1 protein and to identify its biological characteristics. **Methods:** The plasmid FOXQ1 was stably transfected into MDA-MB-231-luc cells by Lipo-2000. After screening the culture by G418, the expression of FOXQ1 was detected by RT-qPCR and Western blot, and then series of experiments such as cell migration and invasion assay were performed to check the change of MDA-MB-231-luc cells in its aggressive behavior. **Results:** It was proved that MDA-MB-231-luc cells over-expressing FOXQ1 become more malignant than the control. **Conclusion:** The stable breast cancer cell sublines over-expressing FOXQ1 can be successfully established. Over-expression of FOXQ1 could promote cell migration and invasion of 231-luc.

Key words FOXQ1; over-expression; breast cancer; migration; invasion

乳腺癌是一种高度异质性的肿瘤, 同一分期、同一病理类型并采用相同治疗方案的患者, 预后疗效不尽相同。传统的诊断治疗方法虽然有一定效果, 但不能快速准确地诊断乳腺癌分子亚型并进一步指导乳腺癌的个体治疗。与此同时, 越来越多的研究证实乳腺癌预后与许多分子标志物密切相关, 因此探索乳腺癌发病、转移的分子机制成为乳腺癌诊断治疗的热点。叉头框转录因子 (forkhead box, FOXs) 是一类进化保守的转录调控因子, 由于其转录调控功能的多样性, 可调控细胞的增殖、分化、凋亡和迁移等广谱生物学过程, 而 FOXs 基因的突变和失调常常是肿瘤发展和疾病发生的关键因子^[1]。其中, FOXQ1 的表达与多种肿瘤的发生发展均存在密

切关系^[2-7]。为了更好地研究 FOXQ1 在乳腺癌发病、转移中的作用, 本研究成功建立稳定过表达 FOXQ1 的 MDA-MB-231-luc 细胞系。这为进一步开展体内、体外实验, 研究其在乳腺癌发生发展中的功能奠定了坚实的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和试剂 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231-luc-D3H2LN (231-luc, MDA-MB-231 表达荧光素酶的亚克隆) 来自美国 Caliper Life Sciences 公司。RPMI-1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司, G418 购自美国 Sigma 公司, RNA 抽提试剂 Trizol、反转录试剂、实时定量 PCR 试剂、LipofectamineTM 2000 均购自美国 Invitrogen 公司, Transwell 小室购自美国 BD 公司。

作者简介 蔡隼 (1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; E-mail: caijun9865@126.com。

1.1.2 抗体 FOXQ1 抗体购自美国 Abcam 公司, Fn1 和 Vim 抗体购自美国 BD 公司, Flag 和 β -actin 抗体购自美国 Sigma 公司, 辣根过氧化物酶标记 (HRP) 的羊抗鼠抗体和 HRP 标记的羊抗兔抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 231-luc 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 5% CO_2 、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, 用于体外实验。

1.2.2 FOXQ1 质粒鉴定 FOXQ1 (myc-ddk-tagged) 质粒购自美国 OriGene 公司, 载体为 pCMV6 Entry, 采用 *SgfI* 和 *MluI* 限制性内切酶插入 FOXQ1 完整的 ORF 序列, C 末端带有 myc 和 ddk (即 Flag) 标签蛋白。转化 DH5 α 感受态细胞, 用含卡那霉素的 LB 琼脂糖平板培养, 扩增后送北京六合华大基因公司测序验证, 确认表达框无误。

1.2.3 建立稳定过表达 FOXQ1 细胞系 将 FOXQ1 质粒按照 LipofectamineTM 2000 使用说明书转染 231-luc 细胞, 24 h 后重悬细胞, 细胞密度为 5 000 个细胞每 10 cm 的培养皿, 48 h 后用含有 G418 的培养液筛选稳定转染的细胞克隆。待组成克隆的细胞数约为 60 个时, 胰酶消化细胞并培养、提取细胞 mRNA 和蛋白, 分别进行 RT-qPCR 和 Western blot 验证。

1.2.4 RT-qPCR 检测 FOXQ1 的表达 收集转染 24 h 的细胞, 用 PBS 冲洗 2 遍, 加 500 μL Trizol 裂解液到 6 孔板, 室温放置 20 min, 提取总 RNA 并反转录。RT-qPCR 反应为 20 μL 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 收集转染 48 h 细胞, PBS 重洗 2 遍, 加入 100 μL 细胞裂解液到 6 孔板中收集细胞, 冰浴 30 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清定量。加热变性后, 每组取 40 μg 总蛋白经 SDS-PAGE 变性电泳并转至 PVDF 膜上。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 3 次后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBS-T 洗膜 5 次后与 ECL 化学发光试剂显色 1~2 min, 曝光 X 胶片。

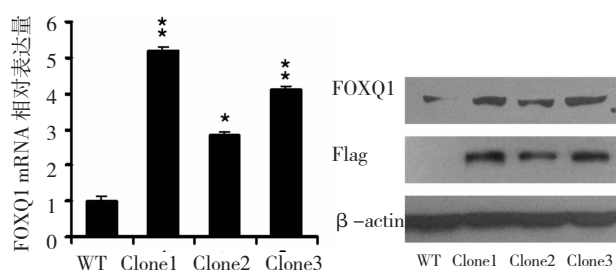
1.2.6 Transwell 迁移实验检测细胞的迁移能力

取对数生长期的细胞, 胰酶消化后, 细胞计数。上室加入 500 μL 含 2.5×10^4 个细胞的无血清 RPMI-1640 重悬的细胞悬液, 下室加入 750 μL 含 20% FBS 培养液。置于孵箱培养 12 h 后, 用棉签擦去基质胶和小室内的细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, Gimesa 染色 20 min 后去离子水洗 3 遍, 封片, 镜下观察计数并采集图像。

1.2.7 Transwell 侵袭实验检测细胞的侵袭能力 首先将 -20 °C 保存的 Matrigel Invasion Chamber (包被有 Matrigel 胶以模拟体内基底膜) 室温放置 30 min, 在上室、下室中各加入 500 μL 无血清 RPMI-1640, 37 °C 孵箱水化 2 h 后, 弃去无血清 RPMI-1640。其余操作同迁移实验。

2 结果

2.1 稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 乳腺癌细胞系的建立 见图 1。人乳腺癌细胞系 231-luc 转染 FOXQ1 质粒后, 经 G418 筛选获得稳定细胞系 231-luc-Clone1、231-luc-Clone2 和 231-luc-Clone3。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 与野生型细胞相比, Clone1/2/3 细胞中 FOXQ1 mRNA 和蛋白表达量均增加, 其中 Clone1 和 Clone3 细胞中的 FOXQ1 表达量较 Clone2 更为明显。由于 FOXQ1 的 C 末端带有 Flag 标签, 所以用 Flag 的抗体也可以反映出 FOXQ1 在 231-luc 各个稳定克隆中的表达情况, Western blot 检测 Flag 结果与 FOXQ1 结果相一致。结果表明筛选得到的 231-luc 克隆细胞中 FOXQ1 稳定过表达。

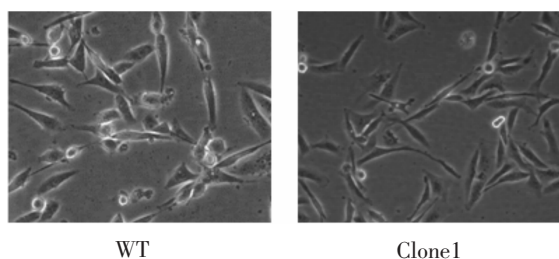


与对照组比较, ** $P < 0.01$, 与对照组比较, * $P < 0.05$

图1 RT-qPCR 和 Western blot 证实稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 细胞系构建成功

Fig 1 RT-qPCR and Western blot confirmed that stable cell lines 231-luc with over-expression of FOXQ1 were successfully established

2.2 稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 细胞的形态变化 观察平板中生长的稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 细胞发现, Clone1 细胞明显变得细长, 伪足增多, 间质化特征更加明显 (图 2)。

图 2 细胞形态观察($\times 200$)Fig 2 The cell morphology of 231-luc, 231-luc-Clone1($\times 200$)

2.3 稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 细胞的上皮间质转化增强 采用 Western blot 方法检测 231-luc 稳定过表达 FOXQ1 克隆中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)间质标志物 Fn1 和 Vim 蛋白的表达,由图 3 可知,与野生型细胞相比,3 个克隆中 Fn1 和 Vim 蛋白表达量均明显增多,其中 Clone1 和 Clone3 的 Fn1 和 Vim 蛋白表达变化水平较 Clone2 的表达更明显,这与图 1 中各个克隆中 FOXQ1 稳定过表达水平相一致。

2.4 过表达 FOXQ1 增强 231-luc 的迁移能力 对 231-luc、231-luc-Clone1、231-luc-Clone2 和 231-luc-Clone3 4 组细胞进行 Transwell 迁移实验,图 4

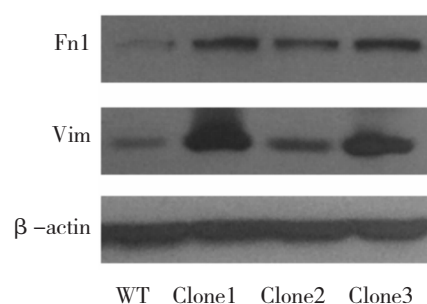
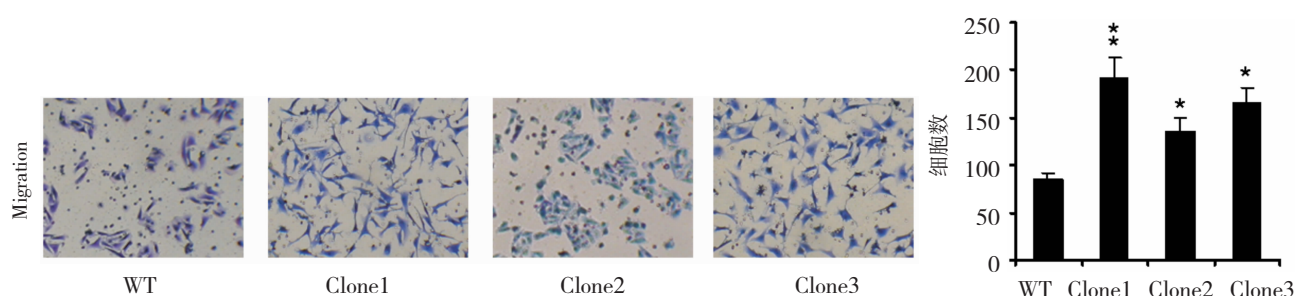
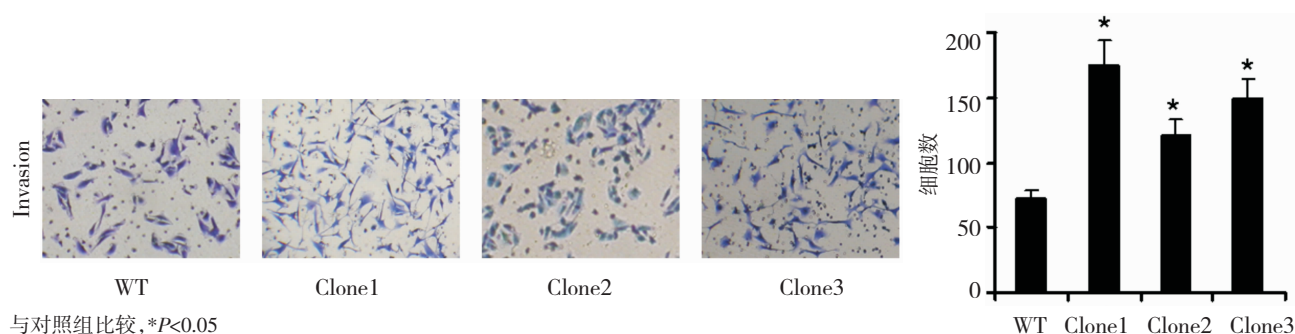


图 3 Western blot 分析 231-luc、231-luc-Clone1、231-luc-Clone2 和 231-luc-Clone3 中 Fn1 和 Vim 蛋白表达量

Fig 3 Fn1 and Vim expression in 231-luc cell lines by Western blot analysis

结果显示,稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 克隆穿过的细胞数明显多于野生型的 231-luc。

2.5 过表达 FOXQ1 增强 231-luc 的侵袭能力 Transwell 侵袭实验结果显示,稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 克隆细胞穿过铺有 Matrigel 胶基底膜的细胞数明显多于野生型。说明过表达 FOXQ1 可增强 231-luc 的侵袭能力(图 5)。

与对照组比较,** $P < 0.01$,与对照组比较,* $P < 0.05$ 图 4 过表达 FOXQ1 增强 231-luc 的迁移能力($\times 200$)Fig 4 Over-expressing of FOXQ1 promoted the migration ability of 231-luc($\times 200$)与对照组比较,* $P < 0.05$ 图 5 过表达 FOXQ1 增强 231-luc 的侵袭能力($\times 200$)Fig 5 Over-expressing of FOXQ1 promoted the invasion ability of 231-luc($\times 200$)

3 讨论

人 FOXQ1 基因属于 FOXQ 基因亚家族,位于人染色体 6p25.3,编码 403 个氨基酸,能够识别和结

合特异性的 DNA 序列为[A(A/T)TGTTTA(G/T)(A/T)T]。FOXQ1 是上皮细胞极性的重要调节物,参与调节体内许多器官发育中的上皮分化和细胞增殖^[8]。

近些年来发现 FOXQ1 转录因子在肝癌^[2]、非小细胞肺癌^[3]、胃癌^[4]、结肠癌^[5]、膀胱癌^[6]、乳腺癌^[7]等许多肿瘤中高表达,并与肝癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌等肿瘤的预后差有密切关系。FOXQ1 在癌症发生中起到的作用也受到越来越多的关注。

Kaneda 等^[5]发现 FOXQ1 在结肠癌中过表达,导致 VEGFA、WNT3A、RSPO2 和 BCL11A 等促肿瘤生长的因子表达上调,从而促进结肠癌的发生发展、血管生成以及抗凋亡。这提示 FOXQ1 可能在乳腺癌中也存在介导血管生成和抗凋亡作用。有文献报道,MCF7、BT20 等多种上皮细胞系过表达 FOXQ1 会造成细胞大量死亡^[7]。为了研究 FOXQ1 在体内乳腺癌转移中是否也存在调控血管生成、抗凋亡机制,我们选择表达荧光素酶的 231-luc 细胞构建过表达 FOXQ1 的稳定克隆。

本研究将表达 FOXQ1-myc-ddk 的真核表达质粒转染 231-luc 细胞,通过 G418 筛选,利用 RT-qPCR 和 Western blot 方法检测发现,FOXQ1 在 231-luc-clone1/2/3 中的表达量均较野生型 231-luc 中的表达量明显增加。

EMT 是细胞迁移运动能力改变的重要机制。此过程中,粘连的上皮细胞失去细胞间连接和细胞极性并获得间质特性,包括间质基因表达、纤维状表型、细胞骨架发生的重大改变等,使得其表现出运动性和浸润性增加^[9-11]。大量证据表明,EMT 在肿瘤的进展和转移中发挥重要作用^[12-13]。实验发现稳定过表达 FOXQ1 的 3 个 231-luc 克隆中,Clone1 和 Clone3 的 FOXQ1 表达量明显比 Clone2 多,在形态学上也较 231-luc 野生型更为细长,伪足数量显著增加,间质标志物 Fn1、Vim 的蛋白表达明显增多,并且迁移侵袭能力更强,这表明过表达 FOXQ1 能够促进 EMT 的发生。这与文献报道 FOXQ1 可通过直接抑制 E-cadherin^[7],诱发乳腺上皮细胞发生 EMT,进而发生转移的结论相一致。上述实验结果表明稳定过表达 FOXQ1 的 231-luc 细胞系构建成功。

有文章报道称 FOXQ1 抑制阿霉素或喜树碱所诱导的细胞凋亡^[5],细胞凋亡功能的异常不仅在肿瘤的发生和发展过程中发挥了重要作用,还参与介导肿瘤细胞的多药耐药,使肿瘤细胞对多种化疗药物的凋亡耐受产生耐药性^[14-17]。这提示 FOXQ1 可作为乳腺癌治疗上的一个突破点,对基底样乳腺癌的治疗具有重大指导意义。此外,本研究中,笔者成功筛选得到多个 FOXQ1 过表达且 FOXQ1 表达程度不同的 231-luc 稳定克隆细胞系,这就为进一步研究 FOXQ1 在体内乳腺癌转移、血管生成、抗凋亡机

制以及以 FOXQ1 为靶点开发抗肿瘤药物提供了有用的细胞研究模型。

参考文献:

- [1] Hannenhalli S, Kaestner K H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(4): 233
- [2] Wang W, He S, Ji J, et al. The prognostic significance of FOXQ1 oncogene overexpression in human hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2013, 209(6): 353
- [3] Feng J, Zhang X, Zhu H, et al. FoxQ1 overexpression influences poor prognosis in non-small cell lung cancer, associates with the phenomenon of EMT [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39937
- [4] Liang S H, Yan X Z, Wang B L, et al. Increased expression of FOXQ1 is a prognostic marker for patients with gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 2605
- [5] Kaneda H, Arao T, Tanaka K, et al. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(5): 2053
- [6] Zhu Z, Pang Z, Xing Y, et al. Short hairpin RNA targeting FOXQ1 inhibits invasion and metastasis via the reversal of epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(4): 1271
- [7] Zhang H, Meng F, Liu G, et al. Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1292
- [8] Feuerborn A, Srivastava P K, Kuffer S, et al. The Forkhead factor FoxQ1 influences epithelial differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3): 710
- [9] Micalizzi D S, Farabaugh S M, Ford H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 117
- [10] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*, 2009, 19(2): 156
- [11] Al Saleh S, Sharaf L H, Luqmani Y A. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(5): 1197
- [12] Philip R, Heiler S, Mu W, et al. Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2046
- [13] Tan E J, Kahata K, Idas O, et al. The high mobility group A2 protein epigenetically silences the Cdh1 gene during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1): 162
- [14] Jaspers J E, Sol W, Kersbergen A, et al. BRCA2-deficient sarcomatoid mammary tumors exhibit multi-drug resistance [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(4): 732
- [15] Colombo F, Trombetta E, Cetrangolo P, et al. Giant lysosomes as a chemotherapy resistance mechanism in hepatocellular carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114787
- [16] Culjkovic-Kraljic B, Zahreddine H A, Borden K L. Inducible drug modification: A new form of resistance[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(16): 2485
- [17] Taube J H, Herschkowitz J I, Komurov K, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(35): 15449

(2014-12-22 收稿)