

Pokemon 对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭迁移能力的影响

祖旭宇,谭莉,周茜,王艺蓁

(南华大学附属第一医院临床医学研究所,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 建立稳定表达 pokemon 乳腺癌细胞系,并观察 pokemon 对乳腺癌细胞系 MCF-7 侵袭转移能力的影响。 **方法** 构建表达 pokemon 慢病毒载体,将 Pokemon 表达慢病毒载体转染 MCF-7 细胞,通过 Western blot 方法检测稳定性表达 pokemon MCF-7 细胞中 Pokemon-GFP 融合蛋白的表达情况,应用 Transwell 试验及划痕实验观察 pokemon 的高表达对 MCF-7 细胞侵袭迁移能力的影响。 **结果** 成功建立稳定表达 pokemon 的 MCF-7 细胞系,pokemon 可抑制 MCF-7 细胞侵袭能力。 **结论** Pokemon 可抑制 MCF-7 细胞侵袭能力。

关键词: pokemon; 慢病毒载体; MCF-7 细胞; 细胞侵袭能力

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A

The Effect of Pokemon on the Invasion and Migration Ability of MCF-7 Cells

ZU Xuyu, TANG Li, ZHOU Xi, et al

(Institute of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To establish MCF-7 cells with stably ectopic pokemon expression and to assess the effect of pokemon on the invasion and migration of MCF-7 cells. **Methods** Immunofluorescence and Western blot were used to screen the MCF-7 cell clones with ectopic pokemon expression. Transwell and wound healing analysis were utilized to determine the effect of pokemon on the invasion and migration of MCF-7 cells. **Results** The MCF-7 cell line with stably ectopic pokemon expression was established and Pokemon was demonstrated to suppress the invasion ability of MCF-7 cells. **Conclusion** Pokemon could suppress the invasion ability of MCF-7 cells.

Key words: pokemon; lentiviral vector; MCF-7 cell line; cell invasion ability

在我国北京、上海和广州等大城市的统计显示乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,且发病率呈逐年上升趋势^[1]。乳腺癌可通过血运和淋巴等方式发生侵袭转移,侵害肺、骨和肝等器官,是乳腺癌患者治疗失败和死亡的主要原因。乳腺癌的转移是一个较为复杂、由多基因参与的过程,目前乳腺癌转移机制尚不完全清楚。Pokemon,即 POK 红髓生成因子(也称为 FBI-1 或 Zbtb7A),由 Zbtb7 基因编码,是

BTB-ZF 家族成员之一,作为转录因子 Pokemon 参与细胞分化和机体发育等多种重要生命活动,有研究显示 Pokemon 在肺癌、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌和鼻咽癌等多种肿瘤中呈现出高表达,表明它可能在多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2-5]。崔明等^[6]利用免疫组织化学方法发现乳腺癌组织中 pokemon 蛋白细胞核表达率明显高于癌旁正常乳腺组织及乳腺增生组织,乳腺癌组织有腋窝淋巴结转移组 pokemon 蛋白细胞核表达率显著高于无腋窝淋巴结转移组,表明 pokemon 基因在乳腺癌发生、发展中发挥重要作用。本文通过构建稳定表达 pokemon 慢病毒载体,建立稳定表达 pokemon 的 MCF-7 细胞系,观察 pokemon 对乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞侵袭转移能力的影响。

收稿日期:2014-05-29

基金项目:国家自然科学基金项目(81272355)和湖南省教育厅青年项目资助(12B108)。

作者简介:祖旭宇,博士、副教授,硕士研究生导师,研究方向:乳腺癌侵袭转移机制,E-mail:zuxuyu0108@hotmail.com.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

MCF-7 细胞购自中科院上海生命科学研究院细胞库。细胞由 DMEM 培养 (Hyclone, UT) 维持, 培养基中均含 10% 小牛血清 (四季青)、2 mmol/L glutamine 和 100 U 青霉素 (碧云天), 细胞置于 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱培养。

1.2 Pokemon 过表达质粒载体构建及慢病毒的包装

Pokemon 过表达质粒载体构建及 Pokemon 过表达慢病毒在 293T 细胞内的包装和病毒滴度的测定参照祖旭宇等^[7] 研究进行。

1.3 病毒转染及稳定细胞系建立

取对数期 MCF-7 细胞按 1×10^5 个/孔种于 6 孔板中, 每孔加 2 mL 培养基, 铺板时细胞融合度为 50% 左右, 并培养 24 h。感染实验分为两组, 即感染含有 GFP 慢病毒载体和含有 FPG-pokemon 融合基因慢病毒载体, 每组占三个孔。当细胞密度达 60% 时, 每孔中加入 1×10^8 TU/mL 滴度的病毒 50 μ L (MOI:50), 置于 37 °C, 5% CO₂ 中培养。12 h 后更换普通培养基, 转染 48 h 后荧光显微镜下观察荧光。观察到绿色荧光后, 利用新霉素筛选稳定表达 pokemon 慢病毒载体的 MCF-7 细胞, 建立稳定性普通表达及高表达 pokemon 的 MCF-7 乳腺癌细胞系。

1.4 Western blot 分析

为检测病毒感染 MCF-7 细胞中 Pokemon-GFP 融合蛋白的表达情况, 对经筛选获得的 MCF-7 乳腺癌细胞系进行免疫印迹分析。将 GFP 慢病毒载体和含有 FPG-pokemon 融合基因慢病毒载体感染 MCF-7 细胞于裂解液 (10 mol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.1% NP-40, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF 和 0.5 mmol/L Na₃VO₄) 中置冰上 30 min 制备细胞抽提物。30 μ g 可溶性蛋白于 12% SDS-PAGE 胶分离, 然后蛋白在 260 mA 下经 2 h 转移至纤维膜。膜由 5% 牛奶在室温下封闭 45 min 后, 孵育 GFP 一抗 (1:500) (Abcam) 1 h, 而后孵育羊抗兔 IgG (1:2000) (Abcam) 1 h。抗体结合由化学荧光系统 (Pierce, IL) 检测。

1.5 Transwell 检测

首先用 700 μ L 含有 15% FBS 的 DMEM 培养基种于 Transwell 小室下室中, 然后将 200 μ L 含 3×10^5 个 MCF-7 细胞悬液种于 Transwell 小室上室,

37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后。取出小室用棉签将膜上层细胞拭去, 4% 多聚甲醛固定 5 min, 0.5% 结晶紫染色, 显微镜下计数染色细胞。

1.6 划痕实验

将稳定转染空白病毒组及 pokemon 表达慢病毒组的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中, 使用含有 10% FBS 的 DMEM 培养 48 h 至融合度 90% 以上时, 用 200 μ L 移液器吸头于细胞表面画直线, PBS 洗两次, 加入无血清培养基, 分别于 0、8、32 h 观察细胞迁移状态。

2 结果

2.1 稳定性表达 Pokemon MCF-7 细胞系建立

将空病毒载体和 pokemon 表达病毒载体感染 MCF-7 细胞后经新霉素筛选获得耐药性细胞克隆。在荧光显微镜下观察稳定性细胞克隆中 GFP 及融合蛋白的表达情况, 发现对照细胞系中绿色荧光主要集中在胞质, 而稳定性表达 pokemon-GFP 融合蛋白表达主要分布于胞核, 这与 pokemon 作为转录因子主要分布于细胞核一致 (图 1)。为进一步证实在稳定细胞系中 pokemon-GFP 融合蛋白的表达情况, 分别提取两组稳转细胞系总蛋白, Western blot 显示空病毒稳转组仅有 GFP 蛋白表达, 而 pokemon 表达慢病毒转染组中 6 号克隆具有 pokemon-GFP 融合蛋白表达, 说明稳定表达细胞系构建成功 (图 2)。

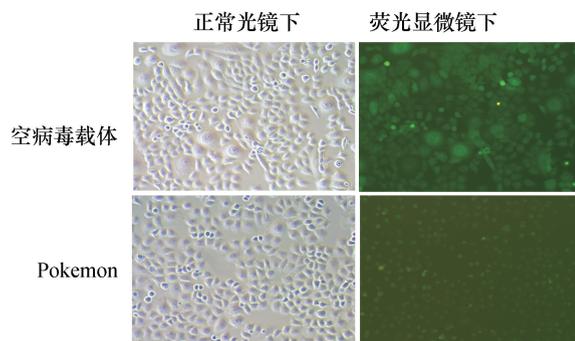


图 1 空病毒载体及 pokemon 表达慢病毒载体 (pokemon) 感染 MCF-7 细胞 ($\times 40$)

2.2 pokemon 对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响

将 3×10^5 个 MCF-7 细胞悬液种于 Transwell 小室上室, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 将膜上细胞擦掉, 膜下室的细胞数量反应了细胞的转移能

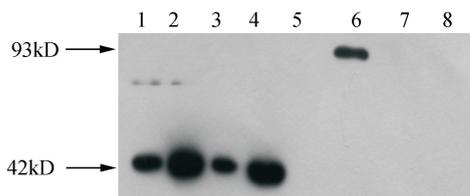


图 2 MCF-7 细胞克隆中 GFP 和 GFP-pokemon 融合蛋白表达 1-4 空病毒感染筛选获得 MCF-7 细胞克隆;5-8 Pokemon 慢病毒感染筛选获得 MCF-7 细胞克隆,6 为表达 Pokemon-GFP 融合蛋白阳性 MCF-7 细胞克隆,5,7,8 为未表达 Pokemon-GFP 融合蛋白阴性 MCF-7 细胞克隆

力。经过染色后,表达 pokemon-GFP 融合蛋白组比对照组(NC 组)到达膜下面的细胞数量明显减少 ($P < 0.05$,图 3)。

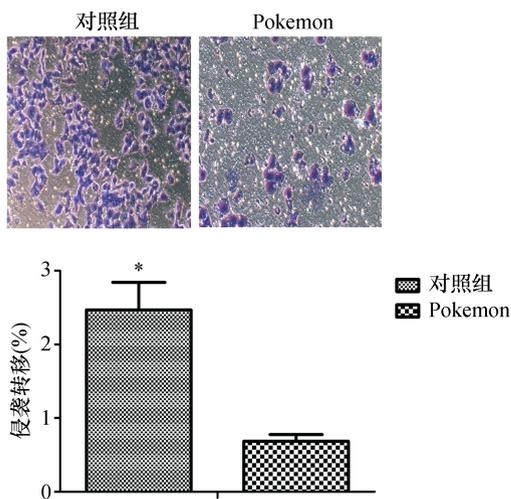


图 3 pokemon 对 MCF-7 细胞侵袭能力影响 与 Pokemon 高表达组比较, * $P < 0.05$

2.5 pokemon 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响

通过划痕实验进一步检测 pokemon 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响,其结果显示,对照组和 pokemon-GFP 融合蛋白组细胞迁移的距离于 8 h、32 h 后无明显变化(图 4)。

3 讨 论

乳腺癌转移是一个受多种因素影响,机制复杂的过程,具体机制尚不清楚,也是乳腺癌防治研究的热点。转移相关基因是一类功能上能够促进或阻断肿瘤转移潜能的基因,是肿瘤转移发生的内在分子基础^[8]。因此揭示相关基因在乳腺癌侵袭转移中

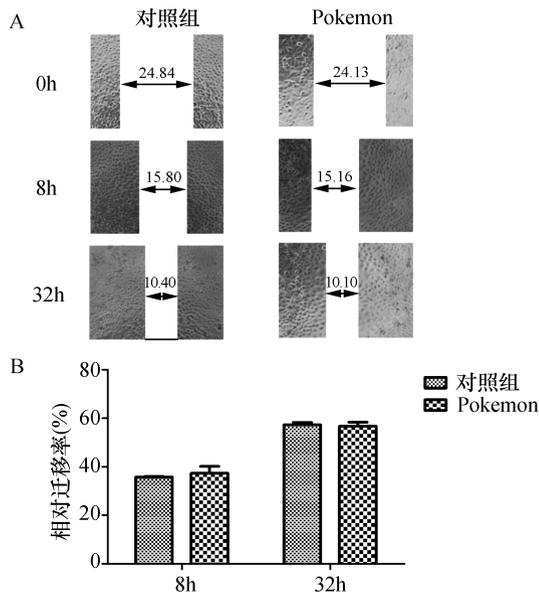


图 4 pokemon 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响 A:划痕实验检测 Pokemon 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响,Pokemon 表达载体转染细胞 8 和 32 h 后,分别测量细胞的迁移距离;B: MCF-7 细胞在不同时间点的相对迁移率

的作用及机制是乳腺癌防治研究的重要课题。Maeda T 等^[9]揭示 Pokemon 可能是一种原癌基因,在肿瘤的形成过程中发挥至关重要的作用。Pokemon 位于多种重要原癌基因的上游,调控多种原癌基因的转录过程,它的靶基因包括 ARF、ADH5/FDH、BIRC5 (survivin)、肿瘤抑制因子 Rb、原癌基因 C-fos 和 C-myc 等。这些靶基因都主要与细胞周期、细胞分化和生物合成有关,说明 pokemon 基因在细胞生长、分化、转移和癌变中的重要作用^[10-11]。已有研究显示和正常乳腺组织相比,乳腺癌细胞中的 pokemon 存在过度表达,且乳腺癌中 pokemon 高表达和腋窝淋巴结转移有关^[12-13]。

慢病毒载体是由慢病毒改造而来的载体系统,其具有高效而稳定的转染率,因此成为近年来稳定转染较常用的载体^[14-15]。由于该病毒载体具有 GFP 和 Puromycin 抗性筛选标记,FIV/Pokemon 重组病毒可进一步用于动物和细胞模型的建立。MCF-7 细胞系是一种经典的乳腺癌细胞系,其具有分化的乳腺癌上皮细胞一些特性,如雌二醇合成以及表达雌激素和孕激素受体^[16],是一种重要的乳腺癌研究细胞模型。本文分别用空白载体及 pokemon 慢病毒载体感染 MCF-7 细胞,通过 Western blot 方法检测并证实了稳定性 MCF-7 细胞克隆中 pokemon-GFP 融合蛋白的表达。

本研究通过成功构建 pokemon 表达慢病毒载体,建立了稳定表达 pokemon-GFP MCF-7 细胞系,并且通过实验发现 pokemon 可抑制 MCF-7 细胞侵袭能力,但对 MCF-7 细胞迁移能力无显著影响。Pokemon 在细胞水平可抑制 MCF-7 细胞侵袭能力,这一现象与在乳腺癌组织中观察到 pokemon 高表达和腋窝淋巴结转移存在正相关不一致。而 Maeda T 等^[9]的研究也发现,虽然 pokemon 可诱发肿瘤的形成,但临床研究却证实 pokemon 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的阳性率与患者的生存期呈正相关。最近 Wang GC 等^[17]的研究证实 pokemon 可通过 Sox9 通路抑制前列腺癌的发生发展,这说明 pokemon 对肿瘤发生的作用可因不同肿瘤基因背景的差异而发生改变。Pokemon 在细胞水平的功能和其与临床预后的相关性存在不一致,这也进一步提示 Pokemon 在肿瘤发生发展中的作用存在复杂性机制。本文在研究蛋白质精氨酸甲基转移酶 (PRMT2) 在乳腺癌发生中的作用时也观察到类似现象:PRMT2 可抑制乳腺癌细胞增殖,但其在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织^[18]。由于细胞较组织器官环境相对单一,基因在细胞与组织器官中可能会表现出不同功能,而对基因在细胞和组织器官中可能存在功能差异机制的阐明,将有助于人们深入了解基因在肿瘤发生发展中的复杂性作用。

参考文献:

- [1] 张保宁. 乳腺癌临床研究的回顾与展望[J]. 中华医学杂志,2005,81(1):1-5.
- [2] Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor pokemon: a new key player in cancer pathogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19):8575-8578.
- [3] Aggarwal A1, Hunter WJ 3rd, Aggarwal H, et al. Expression of leukemia/lymphoma-related factor (LRF/Pokemon) in human breast carcinoma and other cancers [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(2):140-148.
- [4] Aggarwal H1, Aggarwal A, Hunter WJ 3rd, et al. Expression of leukemia/lymphoma related factor (LRF/Pokemon) in human benign prostate hyperplasia and prostate cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(2):226-230.
- [5] Jiao W, Liu F, Tang FZ, et al. Expression of the pokemon proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma cell lines and tissues [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(11):6315-6319.
- [6] 崔明,徐海,杨彦. Pokemon 蛋白在乳腺癌中的表达及意义 [J]. *临床外科杂志*, 2007, 15(6):399 - 401.
- [7] 祖旭宇,刘文,谭晶晶. Pokemon 表达慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(4):332-335.
- [8] Park D, Karsen R, Axcrone U, et al. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis [J]. *APMIS*, 2007, 115(1):52-65.
- [9] Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene pokemon in cellular transformation and ARF repression [J]. *Nature*, 2005, 433(7023):278-285.
- [10] Jeon BN, Yoo JY, Choi WI, et al. Proto-oncogene FBI-1 (Pokemon/ZBTB7A) represses transcription of the tumor suppressor Rb gene via binding competition with Sp1 and recruitment of corepressors [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48):33199-33210.
- [11] Choi WI, Jeon BN, Yun CO, et al. Proto-oncogene FBI-1 represses transcription of p21^{CIP1} by inhibition of transcription activation by p53 and Sp1 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 84(19):12633-12644.
- [12] Qu HY, Qu DN, Chen FH, et al. ZBTB7 Overexpression contributes to malignancy in breast cancer [J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(6):672-678.
- [13] Zu XY, Ma J, Liu HX, et al. Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2):R26.
- [14] 王淑艳,张愚. 慢病毒载体的设计及应用进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(11):70-75.
- [15] Lois C, Hong E J, Pease S, et al. Germ line transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors [J]. *Science*, 2002, 295(5556):868-872.
- [16] 叶静,李明华,龙霞. 乳腺癌 MCF-7 细胞分子生物学特性 [J]. *实用癌症杂志*, 2012, 27(2):116-119.
- [17] Wang G, Lunardi A, Zhang J, et al. Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7):739-746.
- [18] Zhong J, Cao RX, Zu XY, et al. Identification and characterization of novel spliced variants of PRMT2 in breast carcinoma [J]. *FEBS J*, 2012, 279(2):316-335.

(此文编辑:蒋湘莲)