

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000047

转录因子 Twist 基因慢病毒质粒构建及其促进乳腺癌上皮细胞 MCF-7 上皮间质转化

胡 萍, 杨佳佳, 黄 翼, 曾宗跃, 唐 曦, 黄杰涛, 柳满然
(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建转录因子 Twist 基因的慢病毒质粒,其高表达促进乳腺癌上皮细胞 MCF-7 上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)。**方法:**pcDNA3/myc-tagged-Twist 质粒扩增并亚克隆至载体 pLVX-puro 中构建成 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 慢病毒质粒。将其转染人胚肾细胞 HEK293T,收取病毒上清感染乳腺癌 MCF-7 细胞。免疫荧光法和蛋白质印迹法(Western blot)检测转录因子 Twist 蛋白、上皮标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、间质标志蛋白波形蛋白(Vimentin)的表达。Transwell 法检测细胞侵袭能力。**结果:**pLVX-puro-myc-tagged-Twist 慢病毒质粒酶切及测序结果完全正确;相对于对照细胞(MCF-7-Vector 细胞),转染 Twist 基因的 MCF-7 细胞(MCF-7-Twist 细胞)Twist 蛋白、间质标志蛋白 Vimentin 表达水平明显升高,上皮标志蛋白 E-cadherin 表达水平明显降低($P<0.05$),侵袭能力显著增强($P<0.05$)。**结论:**pLVX-puro-myc-tagged-Twist 慢病毒质粒构建成功,转录因子 Twist 通过 MCF-7 细胞上皮间质转化促进了乳腺癌侵袭能力增强。

【关键词】Twist;慢病毒;MCF-7;侵袭;上皮间质转化

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-08-30

Construction of lentivirus expression vector containing transcription factor Twist gene and its effect on promoting epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells MCF-7

Hu Ping, Yang Jiajia, Huang Yi, Zeng Zongyue, Tang Xi, Huang Jietao, Liu Manran

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Founded Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct lentivirus expression vector containing Twist gene and to explore its overexpression induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in MCF-7 of breast cancer cells. **Methods:** pcDNA3/myc-tagged-Twist plasmid was amplified by PCR and then cloned into pLVX-puro-vector. After the construction being transfected into HEK-293 cells, the supernatant was collected to infect the MCF-7 cells. The expression of Twist E-cadherin and Vimentin was analyzed by immunofluorescence and Western blot. The invasive ability was evaluated by Transwell invasion assay in MCF-7-Twist cells. **Results:** The pLVX-puro-myc-tagged-Twist was confirmed correctly by DNA sequencing. Compared with that of vector control cells, the expression of Twist, E-cadherin and Vimentin was much higher and the invasive ability was much stronger in MCF-7-Twist cells ($P<0.05$). **Conclusions:** The recombinant lentivirus vector expressing Twist is constructed and is efficaciously expressed in MCF-7 cells, which could significantly promote the invasion ability of MCF-7 cells through EMT.

【Key words】Twist; lentivirus; MCF-7; invasion; epithelial to mesenchymal transition

上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT),是细胞去分化或再分化的一种生理过程。EMT 是上皮细胞失去上皮特性获得间质细胞表型的一种生物现象,发生 EMT 后,细胞 E-钙黏蛋

白(E-cadherin)、角蛋白等上皮标记基因表达降低,波形蛋白(Vimentin)、纤维连接素、N-钙黏蛋白等间质标记基因表达升高。EMT 参与肿瘤侵袭转移,在肿瘤转移过程中,癌细胞通过 EMT 获得间质细胞表型和侵袭性,实现对周围组织的浸润,因而 EMT 往往是肿瘤浸润、转移的前奏^[1],目前已知的与乳腺癌 EMT 密切相关的转录调控因子有 Snail、Twist、Zeb1 等。其中 Twist 是导致 EMT 的重要转录调控因子。

Twist 是一种高度保守的转录因子,属于碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族中重要成员之一^[2],最初发现于果蝇 *D.melanogaster*^[3]。在果蝇的胚胎发育中,

作者介绍:胡 萍,Email:huping5088@163.com,

研究方向:乳腺癌转移机制的研究。

通信作者:柳满然,Email:mlu-hncq@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:NSFC,31171336);高校博士点基金资助项目(编号:2010550311001,20125503110001);教育部留学回国启动基金资助项目(编号:教外司[2011]508号)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000047.html

Twist 诱导 Snail 在预定的中胚层位置特异表达,引起的细胞迁移对果蝇中胚层形成不可或缺且广泛参与了细胞增殖分化、器官生长发育、肿瘤发生等过程的调控^[4]。研究表明 Twist 可诱导 EMT,促进肿瘤细胞的侵袭^[5]。

本实验通过构建重组慢病毒 Twist 基因,并将其导入乳腺肿瘤细胞 MCF-7, Twist 促进乳腺肿瘤细胞 MCF-7 的 EMT,显著促进了乳腺肿瘤细胞 MCF-7 的侵袭,这为探讨 Twist 基因在乳腺肿瘤中的异常表达引起的生物生理意义和临床应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 质粒、菌株及细胞 pLVX-puro 载体、辅助质粒 pMD2.G、psPAX2、乳腺肿瘤 MCF-7 细胞、HEK293T 细胞和大肠杆菌 DH5 α 均由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、DNA marker λ -EcoT14I digest、DL1000、DL12000 限制性内切酶 BamH I、Xba I 和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司;DMEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司;脂质体 Lipofectamine[™] 2000 购自 Invitrogen 公司;兔抗人 Twist 多克隆抗体购自 Abcam 公司(货号:Ab50887);鼠抗人标签 myc 多克隆抗体(货号:AP0031M),兔抗人 E-cadherin(货号:BS1098)和 Vimentin(货号:BS1491)多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(货号:A0208), β -actin(货号:AA128)和 FITC 标记山羊抗兔 IgG(货号:A0562)购自碧云天生物技术研究。

1.1.3 细胞培养 HEK293T 细胞和乳腺肿瘤 MCF-7 细胞均购买于中国科学院细胞库,HEK293T 细胞于 DMEM 高糖培养基加 10%FBS 培养,MCF-7 细胞于 RPMI1640 高糖培养基加 10%FBS 培养。

1.1.4 引物的设计及合成 根据 Twist 基因编码片段,设计 1 对特异性引物,序列如下:上游 P1:5'-CCGCTCGAGTGGC-TAACTAGAGAACCCACT-3'(下划线部分为 Xho I 酶切位点),下游 P2:5'-GCTGGTCTTCCGCCTCAG-3',PCR 扩增产物大小为 961 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 Twist 基因的 PCR 扩增

以质粒 pcDNA3/myc-tagged-twist 为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,反应体系如下:2 $\times$ PCR 缓冲液 25 μ l,dNTP (2.5 mmol/L)4 μ l,引物 P1、P2(10 μ mol/L)各 1 μ l,DNA 聚合酶(2.5 U/ μ l)0.5 μ l,模板 1 μ l,纯 H₂O 17.5 μ l,总体积 50 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;98 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 11 s,共 34 个循环,再延伸 3 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 重组慢病毒质粒的构建

将回收得到的 PCR 产物和慢病毒载体 pLVX-puro-vector 分别用酶 BamH I 和酶 Xba I 进行双酶切,胶回收目的基因片

段和载体片段,经 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布氨苄西林(100 μ g/ml)抗性平板,挑取阳性菌落,提取质粒后,经 BamH I 和 Xba I 双酶切鉴定,送往上海英骏生物技术有限公司测序。鉴定正确的重组质粒命名为 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 质粒。

1.4 慢病毒的包装及纯化

取对数生长期的 HEK293T 细胞,按每孔 2×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养细胞达 50%~70%密度。取重组质粒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 质粒 4 μ g,辅助质粒 psPAX2 3 μ g,pMD2.G 1 μ g,用去离子水 100 μ l 溶解,按 Lipofectamine[™] 2000 操作说明感染 HEK293T 细胞。分别收集 36 h 和 48 h 的病毒上清,离心后上清经 0.45 μ m 滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C、1 200 r/min 离心 10 min,共 2 次,收集上清液,置-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 蛋白表达鉴定

病毒感染 72 h 后,分别离心收集实验组(慢病毒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 感染组)细胞和对照组(感染 pLVX-puro-vector 空载组)细胞,加入适量蛋白裂解液,冰上静置 30 min,离心后取上清蛋白溶液,用 BCA 法测定各蛋白浓度,经 SDS-PAGE 分离,半干法转移至硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉室温封闭 3 h,加入 Twist 抗体(1:500)、myc 抗体(1:1 000 稀释),E-cadherin 抗体(1:1 000 稀释),Vimentin 抗体(1:1 000 稀释)及 β -actin 抗体(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000),室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,ECL 发光显色,凝胶成像分析仪采集图像。

1.6 MCF-7 细胞 EMT 化鉴定

采用免疫荧光法,取对数期生长的 MCF-7 细胞胰酶消化离心重悬后以 2×10^5 个/ml 接种于底部放有小玻片的 24 孔板中,置于细胞孵箱中培养,待细胞生长状态及密度合适后,取出 24 孔板用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次,加入 4%多聚甲醛 200 μ l 固定 20 min,PBS 洗 3 次,10%山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min,加入 E-cadherin 抗体(1:2 500 稀释)和 Vimentin(1:100 稀释)30~40 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,暗室中加入荧光二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C 60 min,PBS 洗 3 次,加入 DAPI(1:10)染核 5 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,封片后,倒置荧光显微镜下拍照。

1.7 MCF-7-Twist 细胞侵袭能力的检测

采用 Transwell 法,按照细胞外基质胶(extracellular matrix glue, ECM Gel):无血清培养基=1:7.5 在冰上稀释成使用液。把枪头剪去一小段(约 3 μ m)后在冰上吸取 40 μ l/孔 ECM Gel 使用液轻轻加入 24 孔板的 8.0 μ m 的 Transwell 上室中,取实验组、对照组的细胞,分别接种 10 000 个细胞加 200 μ l 无 FBS 的 RPMI1640 培养基到 Transwell 小室内,小室下加 500 μ l 含 FBS 的 RPMI1640 培养基,每组设置 3 个复孔。孵育 24 h 后,将小室内未发生侵袭的细胞用棉签移除,将小室背面的细胞用 0.1%的结晶紫染色并显微镜观察结果和统计学计数分析。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析,Western blot 的蛋白表达实验的 2 组标本各重复 3 次分析。实验数据

以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

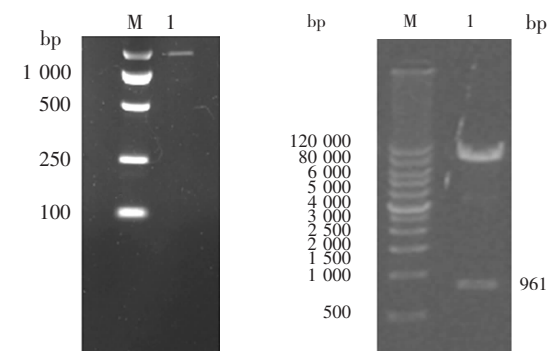
2 结果

2.1 Twist 基因扩增产物的鉴定

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 1 000 bp 的目的基因片段, 大小与预期相符, 表明获得了 Twist 基因 (图 1)。

2.2 慢病毒质粒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 的双酶切鉴定

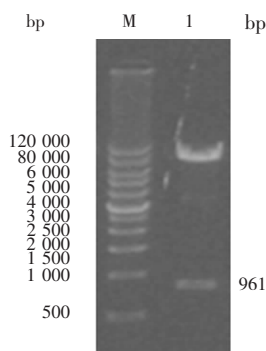
经琼脂糖凝胶电泳分析显示, 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切后的产物约 961 bp 的目的基因条带, 其大小与预期相符, 见图 2。测序结果与已知序列是完全一致, 表明含有 Twist 基因的重组慢病毒质粒构建成功。



M. DNA marker DL1000;

1. Twist 基因的 PCR 扩增产物

图 1 Twist 基因的 RT-PCR 扩增产物电泳图
Fig.1 Electrophoretic profile of RT-PCR product of Twist gene



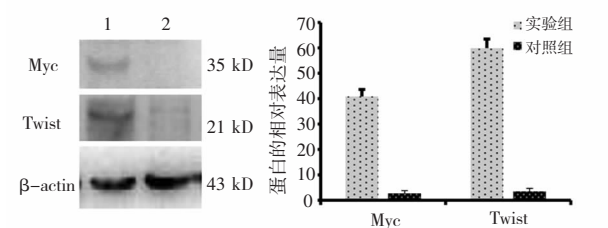
M. DNA marker DL12000;

1. Twist 基因的 PCR 扩增产物

图 2 重组质粒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 的双酶切鉴定
Fig.2 Restriction map of recombinant plasmid pLVX-puro-myc-tagged-Twist

2.3 Twist 基因表达检测

Western blot 分析表明, 感染重组慢病毒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 的乳腺癌上皮细胞 MCF-7 中 myc 标签蛋白和 Twist 蛋白的表达水平明显高于 pLVX-puro-vector 细胞 (图 3)。



1. MCF-7 细胞导入重组质粒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist;

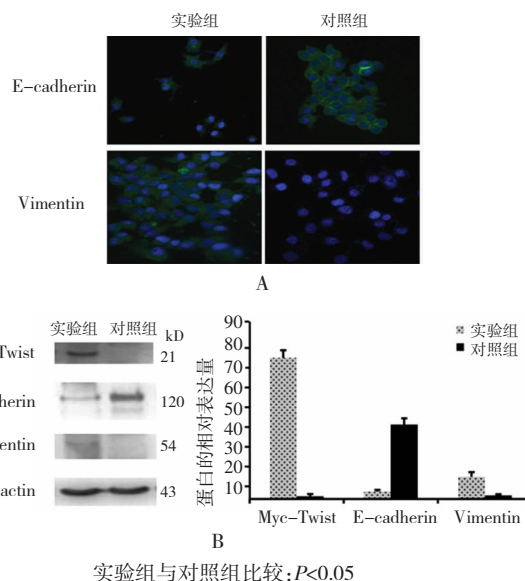
2. MCF-7 细胞导入质粒 pLVX-puro-vector

myc 标签蛋白实验组与对照组比较: $t=43.466$, $P=0.001$

图 3 Western blot 分析 Twist 蛋白在 MCF-7 细胞中的表达
Fig.3 Expression of Twist protein in MCF-7 cells analyzed by Western blot

2.4 高表达 Twist 基因促进乳腺癌肿瘤细胞 EMT

细胞免疫荧光染色 (图 4A) 和 Western blot (图 4B) 分析结果表明, 感染重组慢病毒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 的乳腺癌上皮细胞 MCF-7 中上皮标志膜定位 E-cadherin 蛋白表达下调, 间质标志 Vimentin 表达上调。



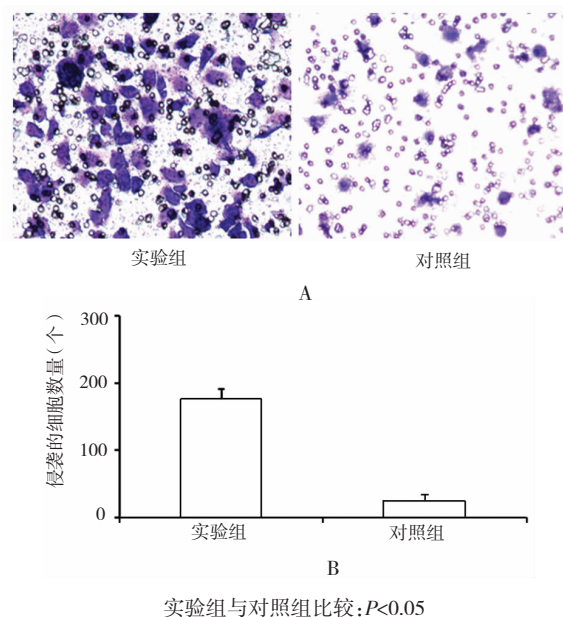
实验组与对照组比较: $P<0.05$

图 4 高表达 Twist 基因促进乳腺癌肿瘤细胞 EMT (400 ×)

Fig.4 Epithelial to mesenchymal transition induced by significant overexpression of Twist (400 ×)

2.5 Twist 对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响

Transwell (采用结晶紫染色法) 实验分析表明, 感染重组慢病毒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 的乳腺癌上皮细胞实验组的侵袭能力明显高于对照组细胞 (图 5)。



实验组与对照组比较: $P<0.05$

图 5 Transwell 实验分析 Twist 蛋白对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响 (400 ×)

Fig.5 Cell invasion ability of MCF-7-Twist cells analyzed by Transwell invasion assay (400 ×)

3 讨 论

Twist 是一种高度保守的转录因子,在胎盘和中胚层来源的组织和细胞中高表达,在胚胎的发生发展中起着重要作用。研究表明, Twist 与乳腺癌转移密切相关且机制多样:① Twist1 通过直接结合到 E-钙黏素的 E-box 区导致乳腺癌细胞 EMT 促进乳腺癌转移^[6];② Twist1 直接结合到 miR-10b 的启动子区间接上调 RhoC 基因的表达而促进乳腺的迁移、侵袭^[7];③ STAT3 能增强 Twist1 的表达而促进乳腺肿瘤发生^[8-9];④ Twist1 在转录水平上诱导 AKT2(一种丝/苏氨酸激酶)从而促进原癌基因的表达^[10];⑤ SRC-1 能与转录因子 PEA3 共同作用,增强 Twist1 表达,促进乳腺肿瘤的侵袭和转移^[11]。Eckert 等^[12]最新研究发现 PDGFR α 是 Twist1 的直接作用的靶基因,通过激活 Src 激酶从而促进乳腺癌的转移。

本研究中高表达转录因子 Twist 后,通过免疫荧光和 Western blot 分析表明,乳腺肿瘤细胞 MCF-7 定位于膜上的上皮标志 E-cadherin 蛋白表达下调,间质标志 Vimentin 表达上调,表明 Twist 促进乳腺肿瘤细胞 MCF-7 EMT,且通过 Transwell 实验证实乳腺肿瘤细胞 MCF-7 侵袭能力明显增强。表明 Twist 在促乳腺肿瘤细胞侵袭中发挥重要作用。

除乳腺肿瘤外, Twist 高表达与食道鳞状细胞癌^[13]、肝癌^[14]、神经胶质瘤^[15]、胰腺癌^[16]等的侵袭和转移密切相关。综上研究,可以推测 Twist 可能是调控多种肿瘤转移和侵袭的开关。本实验通过构建重组慢病毒 pLVX-puro-myc-tagged-Twist 载体,建立了 Twist 促进乳腺肿瘤细胞 EMT 模型,为研究 Twist 在肿瘤侵袭和转移中的作用提供重要实验基础。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷 I 型病毒为基础发展起来的基因表达载体。慢病毒具有可以感染非分裂期细胞、容纳外源性基因片段大,可以长期表达、细胞毒性小等显著优点^[17]。本研究中有用地包装出高滴度 Twist 慢病毒,为进一步研究 Twist 对乳腺肿瘤转移等生物学功能的影响及作用机制提供了重要的实验基础。

参 考 文 献

[1] Foubert E, De Craene B, Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer: the Snail1-Twist1 conspiracy in malig-

- nant breast cancer progression[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(3): 206.
- [2] Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression[J]. Br J Cancer, 2006, 94(1): 13-17.
- [3] Thisse B, El Messal M, Perrin-Schmitt F. The twist gene: isolation of a Drosophila zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(8): 3439-3453.
- [4] Desprez PY, Sumida T, Coppé JP. Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003, 8(2): 225-239.
- [5] Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms[J]. Cell Res, 2012, 22(1): 90-106.
- [6] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. Cell, 2004, 117(7): 927-939.
- [7] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. Nature, 2007, 449(7163): 682-688.
- [8] Ling X, Arlinghaus R B. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice[J]. Cancer Res, 2005, 65(7): 2532-2536.
- [9] Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, et al. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function[J]. J Biol Chem, 2008, 283(21): 14665-14673.
- [10] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, et al. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 1979-1987.
- [11] Qin L, Liu Z, Chen H, et al. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3819-3827.
- [12] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis[J]. Cancer cell, 2011, 19(3): 372-386.
- [13] Yuen HF, Chan YP, Wong MLY, et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(5): 510-514.
- [14] Matsuo N, Shiraha H, Fujikawa T, et al. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 240.
- [15] Elias MC, Tozer KR, Silber JR, et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion[J]. Neoplasia, 2005, 7(9): 824-837.
- [16] Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice[J]. Int J Cancer, 2007, 120(8): 1634-1640.
- [17] Naldini L, Blömer U, Gally P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science, 1996, 272(5259): 263-267.

(责任编辑: 关蕴良)