

慢病毒介导短发夹 ShRNA 沉默 ERβ 乳腺癌细胞株的建立 *

李江鹏¹ 赵华栋¹ 张 健² 李 燕² 何显力^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院普通外科 陕西 西安 710038 ;

2 第四军医大学生物化学与分子生物学实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 利用慢病毒载体短发夹 RNA(shRNA)介导人乳腺癌细胞 ERβ 基因沉默,筛选鉴定,并建立 ERβ 基因稳定下调的乳腺癌细胞株。方法 将靶向沉默 ERβ 基因的 shRNA 慢病毒颗粒感染人乳腺癌细胞株 T47D 和 MCF-7,以未感染及空载体慢病毒感染的 T47D 和 MCF-7 细胞分别作为空白对照和阴性对照。先以慢病毒瞬转 48 h,通过蛋白免疫印迹法(western-blot)进行蛋白水平检测筛选出干扰效果最好的两组,然后继续经浓度为 1 mg/L 的嘌呤霉素连续筛选 4 周,采用 RT-PCR 和 western-blot 方法,分别对 ERβ 在 mRNA 和蛋白水平上的沉默效果进行鉴定。结果 慢病毒感染乳腺癌细胞后,与阴性对照组相比,实验组 ERβmRNA 和蛋白表达量均明显下降(P<0.05),其中 T47D 细胞株 shRNA3326、3327 两实验组下调效果最明显,ERβmRNA 水平和蛋白水平分别达到(61.12± 3.66)%、(76.47± 3.16)%和(60.83± 3.07)%、(53.31± 3.00)%;MCF-7 细胞株 shRNA3325、3326 两实验组下调效果最显著,ERβmRNA 水平和蛋白水平下调率分别为(62.42± 0.07)%、(42.49± 1.96)%和(83.69± 5.07)%、(73.16± 13.21)%。而阴性对照与空白对照组相比无显著性差异,无统计学意义(P>0.05)。结论 成功筛选并建立了 ERβ 基因稳定下调的两株乳腺癌细胞系 T47D 和 MCF-7,从而为后续探究改变 ERβ 表达水平在乳腺癌发生发展及在乳腺癌内分泌治疗效果中的作用提供有用的细胞研究模型。

关键词 雌激素受体 β(ERβ) 乳腺癌细胞株 短发夹状 RNA 慢病毒 感染

中图分类号 R737.9 Q75 Q78 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)16-3029-04

Lentiviral Vector-Mediated Short Hairpin RNA Silences ERβ Gene in Human Breast Cancer Cells Line*

Li Jiang-peng¹, ZHAO Hua-dong¹, ZHANG Jian², LI Yan², HE Xian-li^{1△}

(1 Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, XXi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish a stable ERβ gene silenced cell line of human breast cancer cells by using short hairpin RNA (shRNA) lentiviral vector. **Methods:** The recombinant lentivirus and negative control lentivirus were used to infect MCF-7 and T47D cells. The non-transfected and empty vector MCF-7 and T47D cells were respectively taken as the blank control and negative control. After infected for 48 h, two groups with best interference effect were screened out by Western blot method. Then the two groups were screened by purimycin (1 mg/L) for 4w, and then the ERβ mRNA and protein level were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results:** The expression of ERβ in MCF-7 and T47D cells was significantly decreased at both mRNA and protein level in experimental group, as compared with negative control group (P<0.05). The T47D-ERβ shRNA-3326 and T47D-ERβ shRNA-3327 played a significant role in reducing respectively mRNA level to (61.12± 3.66)% and (60.83± 3.07) %, protein level to (76.47± 3.16)% and (53.31± 3.00)% (P<0.05); And MCF-7-ERβ shRNA-3325 and MCF-7-ERβ shRNA-3326 also played a significant role in reducing mRNA level to (62.42± 0.07)% and (83.69± 5.07)%, protein level to (42.49± 1.96)% and (73.16± 13.21)% respectively (P<0.05); the silence effect showed no significant difference between the non-transfected group and negative control group (P>0.05). **Conclusions:** The successful establishment of a stable and effectively reduced ERβ gene silenced cell lines of two breast cancer cells T47D and MCF-7 provides a powerful and useful cell research model for further study on the role of ERβ gene in the progression and endocrine therapy of breast cancer.

Key words: ERβ; Breast cancer cells line; Short hairpin RNA(shRNA); Lentivirus; Transfect

Chinese Library Classification: R737.9, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3029-04

前言

乳腺癌是一种严重影响妇女身心健康甚至危及生命的最

常见的恶性肿瘤之一。据资料统计,发病率占全身各种恶性肿瘤的 7-10%。而作为一种雌激素依赖性肿瘤,针对雌激素受体 ERα 水平的内分泌治疗在早期乳腺癌术前(后)辅助治疗以及

* 基金项目 国家自然科学基金(30972930) 第四军医大学唐都医院精英人才培育资助计划

作者简介 李江鹏(1984-) 男,硕士,研究方向 腺体及胃肠道肿瘤的基础与临床研究,E-mail: leeyangji0715@163.com

△通讯作者 何显力(1967-) 男,教授,博导,研究方向 腺体及胃肠道肿瘤的基础与临床研究

(收稿日期 2011-10-20 接受日期 2011-11-15)

转移性乳腺癌治疗中的疗效已得到普遍的肯定。但即便如此, ER α (+)患者仍有约 30%会出现内分泌治疗抵抗, 耐药机制十分复杂目前尚无明确结论。自 1996 年 Kuiper^[1]发现另一个雌激素受体亚型 ER β 以来, 其表达水平的改变可能在乳腺癌内分泌治疗抵抗中扮演重要角色。本实验通过慢病毒载体介导 ER β 基因 shRNA 感染人乳腺癌细胞株 T47D 和 MCF-7^[2], 并经过一定浓度嘌呤霉素筛选, 并分别通过 mRNA 和蛋白水平对干涉效果经行验证, 最终成功建立两株稳定下调 ER β 基因的乳腺癌细胞模型。从而, 为下一步研究改变 ER β 水平对乳腺癌细胞的生物学特征的影响以及其在乳腺癌内分泌治疗效果中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 T47D 细胞, 人胚胎肾细胞株 293T 购自中科院上海细胞所; DMEM、1640 培养基和胎牛血清(Gibco 公司), 0.25 %胰蛋白酶及 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司), 质粒 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司), 靶向 ER β 基因的 shRNA 慢病毒表达载体(购自 sigma 公司, 包括 4 个干涉靶序列依次为: TRCN0000003325-CCGGGCGAGTAACAAGGGCATGGAAGTTCGAGTTCCATGCCCTTGTTACTCGCTTTT; TRCN0000003326-CCGGCTTCTCCTTTAGTGGTCCATCTCGAGATGGACCACTAAAGGAGAAAGTTTTT; TRCN0000003327-CCGGCCTTAATTCTCCTTCTCTCTACTCGAGTAGGAGGAAGGAGAATTAAGGTTTTT; TRCN0000003328-CCGGGATGCTTTGGTTGGGTGATTCTCGAGAATCACCCAAA-CCAAAGCATCTTTTT)。阴性对照空载体慢病毒质粒(scramble)和另两个包装质粒(psPAX2 和 pMD2.G)由第四军医大学生物化学与分子生物学实验室提供。抗体: 兔抗人单克隆 ER β 抗体购自 Epitomics 公司, actin 抗体由所在实验室提供。PCR 反应试剂盒和引物均由 rTaKaRa(宝生物工程公司)购买和合成, 其中 ER β 上游引物序列为 5'-TGCTGTCAGCGATTACGCA-3', 下游引物序列 5'-GCGCCGGTTTTATCGATT-3', 产物片段 145bp; 内参 GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)上游引物序列 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物序列 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3', 产物片段 138bp。

1.2 方法

1.2.1 短发夹 shRNA 质粒的提取 超净台中用无菌牙签蘸取 shRNA 甘油菌涂布 LB 平板(含 Ampicillin, AMP) 37 °C 培养过夜, 无菌牙签挑取单克隆菌落, 接种至含 AMP 的 5 ml LB 液菌种管中, 37 °C, 摇床 230 rpm 摇菌 12h。质粒提取步骤按 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒说明书操作。紫外分光光度计(Bio-Rad 公司)质粒定量。scramble 和病毒包装质粒由第四军医大学生物化学与分子生物学实验室提供。

1.2.2 慢病毒包装 取对数生长期的 293T 细胞, 密度约 5×10^6 /ml, 均匀铺于 6 cm 皿中, 37 °C 5 %CO₂ 条件下培养, 待细胞生长密度到达 60 % - 70%时更换新鲜培养基(DMEM) 进行转染。转染条件如下: 干扰载体质粒(shRNA-3325、3326、3327、3328 和阴性对照 scramble)4 μ g, 包装质粒 psPAX23 μ g 和 pMD2.G1 μ g, 稀释于 250 μ l 无血清培养基中, 室温 5 min;

Lipofectamine2000 40 μ l 稀释于 250 μ l 无血清培养基中, 室温 5 min, 然后、混合于室温孵育 20 min 形成复合物, 分别将对应的 500 μ l 复合物转移至细胞培养皿中并加适量完全培养基, 37 °C 5 % CO₂ 条件下培养 12 h, 更换新鲜培养基(约 5 ml), 继续培养, 48 h 后收集培养液上清(约 5 ml), 5000 rpm 低速离心, 然后用 0.45 μ m 滤膜过滤, 分装, -70 °C 保存备用。

1.2.3 病毒感染目的细胞和稳转细胞株的筛选 取对数生长期人乳腺癌 MCF-7 和 T47D 细胞, 分别接种于 6 孔细胞培养板, 不含任何抗生素的 DMEM 和 1640 培养基, 37 °C 5 % CO₂ 条件下培养, 细胞密度达 70 %-80 %时更换新鲜培养基, 然后依次向 6 孔板中加 1 ml 相应病毒液, 加 1 ml 完全培养基(con 组只加 2 ml 培养基), 轻轻混匀, 并按所加病毒液依次做好标记。37 °C 5 % CO₂ 条件下培养 48 h; 分别按常规方法提取蛋白, 通过 western-blot 检测 ER β 蛋白水平(见图 1)。由 western-blot 结果显示, 4 个干涉靶点均能有效下调 ER β 蛋白水平, 其中以 shRNA3326、3327 对 T47D 细胞和 shRNA3325、3326 对 MCF-7 细胞效果最好。然后分别以干涉效果最好组进一步转染两细胞株, 并进行稳转筛选, 添加浓度为 1 mg/L(此浓度为前期筛选的最佳杀伤药物浓度)的嘌呤霉素的培养基, 并固定 2-3 天更换含上述药物浓度的培养基, 连续筛选 4W, 待细胞不再死亡(此时 con 组细胞已完全杀死), 表明阳性克隆已形成。分别将两细胞株各组细胞分别移至培养瓶中培养, 并经连续传 5 代观察细胞形态无明显改变。将上述细胞株命名为 T47D-ER β i-scramble/s1/s2 和 MCF-7-ER β i-scramble/s1/s2。

1.2.4 稳转细胞株干扰效果鉴定

1.2.4.1 mRNA 水平 参照 Trizol 说明书, 分别常规提取两细胞株各自对照和实验组总 RNA, 按 TaKaRa RT-PCR 反转录反应试剂盒(TaKaRa code:DRR037A)说明, 反转录得到相应 cDNA。然后进行 RT-PCR, 25 μ l 反应体系如下: 10 \times PCR buffer2.5 μ l、Taq 酶(5 U/ μ l)0.125 μ l、dNTP 2 μ l、上下游引物各 1 μ l、模板 cDNA 2 μ l, 补去离子水至 25 μ l, 混匀, 放入 PCR 仪中, ER β 程序为 95 °C 5 min、变性 95 °C 30s、退火 55 °C 30s、延伸 72 °C 1min、72 °C 7 min, 35 个循环; 内参照 GAPDH 其他程序一样, 退火温度为 58 °C。取各自 PCR 产物加入适量 10 \times 上样缓冲液, 1.5 %琼脂糖凝胶电泳, 100 V, 30 min, 紫外凝胶成像仪拍照(见图表 2)。ImageJ 图像分析软件对结果进行灰度分析, ER β mRNA 表达下调率 = (1 - ER β / 相应 GAPDH(灰度值的比值))%。

1.2.4.2 蛋白水平 Western-blot 方法检测 分别常规提取对照组(空白对照和阴性对照)和各实验组细胞的总蛋白, 蛋白定量后进行常规 western-blot 检测。计算机扫描蛋白条带(图 3)并作灰度分析。以 β -actin 作内参照, ER β 蛋白表达下调率 = (1 - ER β / β -actin(灰度值的比值))%。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件分析数据, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 稳转细胞株鉴定

2.1.1 mRNA 表达水平 RT-PCR 结果示(图 2): 与对照组相比,

实验组 ERβ mRNA 的表达明显降低($P<0.05$) ,两细胞实验组 ERβ mRNA 下调率分别达 (61.12± 3.66)%、(76.47± 3.16)%和 (62.42± 0.07)%、(42.49± 1.96)% ;而阴性对照组与空白对照组无明显变化($P>0.05$)。以上结果为 3 次测量结果。

2.1.2 两稳转乳腺癌细胞株 ERβ 蛋白表达 Western-blot 检测所得两稳转细胞株各自对照组 (con、scr)、实验组 (T47D-ERβi-s1/s2 ,MCF-7-ERβi-s1/s2)ERβ 蛋白表达水平 (图 3)。经软件图像分析 ,与对照组相比 ,实验组 ERβ 蛋白表达量均有明显降低($P<0.05$) ,其中 T47D-ERβi-s1、s2 两组蛋白量分别下调率为(60.83± 3.07)%和(53.31± 3.00)% ,MCF-7-ERβi-s1、s2 两组下调率达(83.69± 5.07)%和(73.16± 13.21)%。而阴性对照组与空白对照组相比 ,ERβ 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。以上结果均为 3 次测量结果。

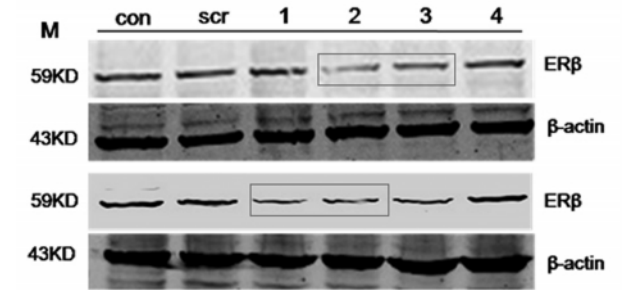


图 1 慢病毒感染两乳腺癌细胞株(瞬转 48 h)Western-blot 显示对 ERβ 蛋白表达的抑制作用

Fig. 1 Western blotting analysis results of the expression of ERβ by lentiviruses infection for 48h in two breast cancer cells line
注 其中上、下图分别为 T47D 和 MCF-7 con 为亲本细胞 ,scr 为阴性对照 ,1-4 依次为干扰靶点 shRNA3325-8
Note: Upper:T47D cells; lower:MCF-7 cells; con: the parental cells; scr: negative control; 1-4:interfering target shRNA3325-8

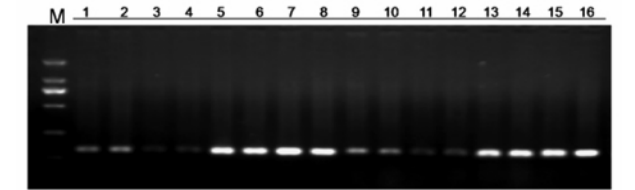


图 2 慢病毒感染目的细胞 经浓度为 1 mg/L 嘌呤霉素筛选 4 W , RT-PCR 结果显示 ERβ mRNA 的表达量

Fig. 2 RT-PCR showed the expression of ERβ mRNA after lentivirus infection with puromycin(1mg/L) for 4W in breast cancer cells
注 其中 1-8 为 T47D 细胞(1-4 依次为 ERβ-con、scr、shRNA3326、shRNA3327 ,5-8 为对应 GAPDH) ,9-16 为 MCF-7 细胞(9-12 依次为 ERβ-con、scr、shRNA3325、shRNA3326 ,13-16 为对应 GAPDH)
Note: 1-8: T47D cells(1-4:ERβ-con, scr , shRNA3326 , shRNA3327; 5-8: GAPDH); 9-16: MCF-7cells(9-12:ERβ-con, scr, shRNA3325, shRNA3326; 13-16: GAPDH)

3 讨论

Roger^[3]等通过对良性乳腺增生和原位癌用定量免疫组化

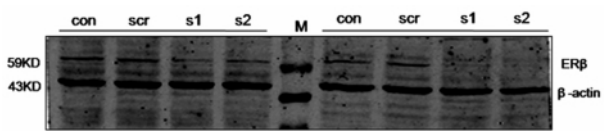


图 3 慢病毒感染目的细胞 经浓度为 1 mg/L 嘌呤霉素筛选 4 W , Western-blot 结果显示 ERβ 蛋白表达量

Fig. 3 Western blotting results of the expression of ERβ protein after lentivirus infection with puromycin(1mg/L) for 4W
注 其中左为 T47D 细胞 ,右为 MCF-7 细胞(con 为空白对照 ,scr 为阴性对照 ,s1 和 s2 为两个干扰靶点)
Note: Left : T47D cells; right : MCF-7 cells(con: the parental cells; scr: negative control; s1 and s2: interfering target)

法检测 ERα 和 ERβ 水平 ,结果显示正常乳腺组织中 ERβ 表达率高 ,而在非典型增生和原位癌组织中却明显下降 ,而 ERα 水平则相反。其他一些国内外文献^[4-7]也得到一致的结论 :ERβ 在正常乳腺组织中的表达明显高于恶性乳腺组织 ,并且在乳腺肿瘤发生发展过程中 ,呈现出 ERα 升高 ERβ 降低 ,ERα/ERβ 比值升高的现象 ,这提示 ERβ 对乳腺组织有保护作用。

内分泌治疗 (如他莫昔芬)耐药是影响乳腺癌治疗效果的重要因素。他莫昔芬临床应用广泛 ,对其耐药机制的研究也成为热点。随着 ERβ 在乳腺癌中的深入研究 ,人们认为其在乳腺癌内分泌治疗耐药机制中扮演重要角色。然而 ,ERβ 表达是否影响乳腺癌内分泌治疗效果有关目前国内外报道尚存争议 :Speires^[8]等运用 RT-PCR 法检测 TAM 治疗敏感和耐药两组患者的 ERβmRNA 表达 ,结果在 TAM 耐药的乳腺癌患者 ERβmRNA 水平明显上调 ,表明 ERβ 过度表达可能在 TAM 耐药中有重要作用。其他研究^[9,10]亦显示 ERβ(或其异构体)阳性细胞对 TAM 不敏感 ,甚至还依赖他莫昔芬生存。而 Myers 等^[10]一些研究显示 ERβ 蛋白表达与乳腺癌低肿瘤分级、腋窝淋巴结阴性转移及高的无病生存率 DFS 相关 ,其低表达预示内分泌治疗抵抗^[11,12] ,国内研究也得到类似结果^[13]。所以 ,ERβ 表达水平是否影响乳腺癌内分泌治疗效果 ,以及能否作为预测乳腺癌内分泌治疗的一个评估分子仍需进一步的研究和明确。

随着近年来新型基因阻断技术载体介导的 RNAi 系统的发展 ,尤其是慢病毒载体能同时感染分裂和非分裂细胞且可将 shRNA 整合到转导细胞基因组 ,实现靶基因的长期稳定沉默,使得建立特定基因敲除细胞或转基因动物模型成为了可能^[14,15]。本实验即通过慢病毒载体携带 ERβshRNA 转导乳腺癌细胞 ,并经嘌呤霉素连续筛选 ,并分别从 mRNA 水平和蛋白水平验证 ERβ 表达量 ,证实我们成功获得了稳定沉默 ERβ 的乳腺癌细胞株 T47D-ERβi 和 MCF-7-ERβi。这为我们后续在体内、外水平探究改变 ERβ 水平对乳腺癌细胞细胞增殖和凋亡等生物学特征的影响 ,以及其在乳腺癌内分泌治疗效果中的作用提供了有用的细胞模型。

参考文献(References)

[1] Kuiper G G, Enmark E, Peltö Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996, 93(12): 5925-5930
[2] 于玲玲,张文光,蒋宇扬,等.Pokemon 基因对 MCF-7 细胞增殖的影

- 响[J].肿瘤药理学,2011,1(5):419-422
- Yu Lin-lin, Zhang Wen-guang, Jiang Yu-yang, et al. The Effect of Over-expression of Pokemon gene on Proliferation of MCF-7 Cells [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(5): 419-422
- [3] Roger P, Mojida Esstimani Sahla, MSSRI, et al. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(6): 2537-2541
- [4] 韩晶, 王培军, 汤如勇, 等. 雌激素受体亚型在不同乳腺组织中的表达及其与乳腺癌关系的研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2005, 26(5): 21-24
- Han Jing, Wang Pei-jun, Tang Ru-yong, et al. The expression of estrogen receptor α and β in different breast tissues and its relation with breast cancer[J]. Journal of Tongji University(Medical Science), 2005, 26(5): 21-24
- [5] 秦凤展, 余明金, 汪子书, 等. 雌激素受体 β 蛋白在乳腺癌中表达的意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(8): 571-574
- Qin Feng-zhan, She Ming-jin, Wang Zi-shu, et al. The expression significance of estrogen receptor beta protein in breast cancers[J]. Chinese Clinical Oncology, 2006, 11(8): 571-574
- [6] Gwendal Lazennec, Damien Bresson, Annick Lucas, et al. ER β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells[J]. Endocrinology, 2001, 142: 4120-4130
- [7] Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor- β mRNA and its variants in human breast cancers [J]. Int J Cancer, 2000, 88: 733-736
- [8] Speires V, Malone C, Walfon DS, et al. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 5421-5424
- [9] Shigehira Saji, Yoko Omoto, Chikako Shimizu, et al. Expression of estrogen receptor(ER) β cx protein in ER α -positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor [J]. Cancer Res, 2002, 62(9): 4849-4953
- [10] Osborne, C.K., et al. Tamoxifen in the treatment of breast cancer[J]. J. New England, 1998, 339: 1609-1618
- [11] Myers E, Fleming FJ, Crotty TB, et al. Inverse relationship between ER β and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer [J]. British Journal of Cancer, 2004, 91(9): 1687-1693
- [12] Mamoun Younes, Naoko Honma. Estrogen receptor β [J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135: 63-66
- [13] Majida Esslimani-Sahla, Joelle Simony-Lafontaine, Andrew Kramar, et al. Estrogen receptor β (ER β) level but not its ER β cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 9(10): 5766-5769
- [14] 徐彬, 方志沂, 刘君, 等. 乳腺癌组织 ER β 表达与内分泌治疗效果和预后的关系[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20: 392-395
- Xu Bin, Fang Zhi-yi, Liu Jun, et al. Correlation between expression of estrogen receptor beta and endocrine therapy result and prognosis in breast cancer patients [J]. Practical Journal of Cancer, 2005, 20: 392-395
- [15] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 6047-6052
- [16] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406